

Modulation der Aufnahme von magnetischen Nanopartikeln durch Tumorzellen und Leukozyten – Einsatz von Zuckerderivaten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

erstellt im Onkologischen Forschungslabor
Klinik für Innere Medizin II
Universitätsklinikum Jena

von Julia Kühn
geboren am 21.02.1981 in Rudolstadt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Andreas Hochhaus, Jena
2. Dr. Tim Liebert, Jena
3. Prof. Dr. Werner Weitschies, Bad Berka

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.12.2010

Meinen beiden Omas in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
ZUSAMMENFASSUNG	7
1. EINLEITUNG	9
1.1. Krebserkrankungen	9
1.2. Disseminierte Tumorzellen.....	10
1.3. Nanotechnologie	11
1.3.1. Arten von Nanomaterialien.....	11
1.3.2. Einsatzmöglichkeiten von magnetischen Nanopartikeln	12
1.3.3. Wechselwirkungen von magnetischen Nanopartikeln mit Zellen	14
1.4. Ziele dieser Arbeit	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1. Geräte und Chemikalien	16
2.2. Zellkultur	18
2.2.1. Zelllinie MCF7	18
2.2.2. Kultivierung und Passagieren der Zellen.....	18
2.2.3. Bestimmung der Zellzahl.....	19
2.3. Leukozytenisolierung aus Vollblut	19
2.4. Magnetische Nanopartikel	19
2.4.1. Neuumhüllung von magnetischen Nanopartikeln.....	21
2.4.2. Hüllsubstanzen der eigenumhüllten Nanopartikel	22
2.4.3. Hüllsubstanzen der Nanopartikel von Innovent e.V.....	23
2.5. Magnetische Zellseparation (MACS)	25
2.5.1. Magnetische Markierung und Sortierung - Aufnahme einer Kinetik	26
2.6. Durchflusszytometrie (FACS).....	27
2.6.1. Apoptose- Assay	29
2.7. Laser Scanning Cytometrie (LSC)	30
2.8. Statistische Methoden	31

3. ERGEBNISSE	32
3.1. Neuumhüllung und Testung von magnetischen Nanopartikeln mit spezifischen Zuckerderivathüllen.....	32
3.1.1. Interaktionskinetiken mit reinen Tumorzell- und Leukozytenkulturen.....	32
3.2. Inkubationsversuche an definierten Mischungen aus Tumorzellen und Leukozyten	35
3.2.1. Tumorzellanreicherung der verschiedenen Nanopartikel	37
3.2.2. Einfluss von humanem Plasma auf die Tumorzellanreicherung.....	41
3.3. Testung magnetischer Nanopartikel der Fa. Innovent e. V., Jena.....	45
3.3.1. Interaktionskinetiken mit reinen Tumorzell- und Leukozytenkulturen.....	45
3.4. Langzeiteffekte magnetischer Nanopartikel auf Tumorzellen.....	47
3.5. Abgleich der <i>in vitro</i> Daten mit Patientenblut.....	52
3.5.1. Abgleich der <i>in vitro</i> Daten mit Patientenblut - Einsatz der eigenumhüllten Partikel.....	54
3.5.2. Abgleich der <i>in vitro</i> Daten mit Patientenblut - Einsatz der Innovent-Partikel.....	55
4. DISKUSSION	58
5. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	70
LITERATURVERZEICHNIS.....	72
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	82
TABELLENVERZEICHNIS	86
ANHANG	87
Lebenslauf.....	97
Danksagung	98
Ehrenwörtliche Erklärung	99

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Å	Ångström (1×10^{-10} m)
Abb	Abbildung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FSC	Forward Scatter
h	Stunde
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
min	Minute
ml	Milliliter (1×10^{-3} l)
µl	Mikroliter (1×10^{-6} l)
NF	Negativfraktion
NP	Nanopartikel
nm	Nanometer (1×10^{-9} m)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-Puffer)
PE	Phosphate Buffered Saline + 2 mmol EDTA
PF	Positivfraktion
PI	Propidiumiodid
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
SSC	Side Scatter
STABW	Standardabweichung
Tab	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop(ie)
VF	Verlustfraktion

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aufnahme magnetischer Nanopartikel in Tumorzellen und Leukozyten unter Einsatz verschiedener Partikelhüllen untersucht. Zur Modifikation der Hüllstruktur kamen die Zuckerderivate Dextran, Carboxy-Dextran, Carboxymethyl-Dextran und Carboxymethyl-Cellulose zum Einsatz. Weiterhin wurden gebrauchsfertige Nanopartikel von Innovent e.V., Jena zur Testung zur Verfügung gestellt: V 200 mit Amino-Dextran-Hülle; V 207 mit Carboxymethyl-Chitosan-Hülle; V 208/2 mit Carboxymethyl- γ -Cyclodextrin-Hülle sowie V 209 mit Carboxymethyl- β -Cyclodextrin als Hüllstruktur. Es ist bekannt, dass magnetische Nanopartikel endozytotisch in Zellen aufgenommen werden. Dabei führt eine Umhüllung mit Dextranderivaten zu einer zelltyp-spezifischen Interaktion. Tumorzellen zeigen in der Regel eine schnelle Aufnahmekinetik, während Leukozyten durch eine vergleichsweise langsamere Interaktion mit magnetischen Nanopartikeln charakterisiert sind. Mittels Magnetseparation können so markierte Tumorzellen separiert und damit aus dem Blut von Krebspatienten entfernt werden. Die Untersuchungen erfolgten an Tumorzellen, stellvertretend dafür wurde die Brustkrebszelllinie MCF7 gewählt, sowie an Blutproben von Mammakarzinom-Patientinnen der Universitätsfrauenklinik Jena. Leukozyten konnten aus venösem Vollblut gesunder Spender isoliert werden. Es wurden Interaktionskinetiken der verschiedenen Partikel erstellt und die Trennbarkeit von Tumorzellen und Leukozyten bewertet. Dies erfolgte an künstlich hergestellten Tumorzell-Leukozytengemischen und abschließend an Patientenblut. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) konnte der Einfluss der magnetischen Nanopartikel auf die Vitalität von Tumorzellen bewertet werden. In dieser Arbeit galt es zu untersuchen, ob die Art der Dextran- Derivatisierung zur Zellspezifität beiträgt und ob die verlangsamte Kinetik der Leukozyten durch den Einsatz anderer Dextranderivate noch verstärkt werden kann. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob die Inkubation von Tumorzellen mit Nanopartikeln zu erhöhtem Zelluntergang führt. Abschließend wurde überprüft, ob die erhaltenen Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen auf Patientenblut übertragen werden können. Im Vergleich der Partikel mit den verschiedenen Zuckerderivatumhüllungen Dextran, Carboxy-Dextran, Carboxymethyl-Dextran und Carboxymethyl-Cellulose ließ sich feststellen, dass die beschriebene zelltyp-spezifische Interaktion mit Tumorzellen und Leukozyten beim

Einsatz aller vier Nanopartikel zu erkennen ist. Der höchste Anteil von Tumorzellen in der Positivfraktion ist bei Carboxymethyl-Dextran umhüllten Nanopartikeln zu verzeichnen (70-90 % nach 16 minütiger Inkubation). Dieses Ergebnis konnte auf ein experimentell erzeugtes Tumorzell-Leukozytengemisch übertragen werden. Hier ließen sich durch den Einsatz von Dextran, Carboxymethyl-Dextran und Carboxymethyl-Cellulose-Partikeln Tumorzellen um das 4-fache in der Positivfraktion anreichern. Im Vergleich zu allen anderen Nanopartikeln sind mit Carboxymethyl-Dextran umhüllten Partikeln Maximalwerte von 60 % Partikelaufnahme in MCF7 bei nur geringen Aufnahmeraten in Leukozyten (10 %) erreichbar. Der Zusatz von 2,5 % humanem Plasma führte zur Reduktion der abgereicherten Tumorzellen in der Positivfraktion. Vom Plasmazusatz stärker beeinflusst zeigten sich Leukozyten, deren Anteil in der Positivfraktion stark absank, was einen Separationsvorteil darstellt und deren Schonung bedeutet. Im Gegensatz dazu ließ sich bei keinem der anderen vier eingesetzten Innovent-Nanopartikeln (Amino-Dextran, Carboxymethyl-Chitosan, Carboxymethyl- γ -Cyclodextrin, Carboxymethyl- β -Cyclodextrin) eine eindeutige Kinetik - weder bei Tumorzellen noch bei Leukozyten - darstellen. Werden Zellkulturen von MCF7 mit Nanopartikeln mehrere Tage inkubiert, fällt auf, dass sich die Tumorzellen am 1. Inkubationstag kaum verändert zeigen gegenüber der Kontrollprobe ohne Partikelzusatz. Im Verlauf wurden unterschiedlich hohe Anteile an geschädigten Zellen beobachtet, am Tag 4 bestehen weitestgehend Anzeichen für eine Erholung der Zellpopulation. Beim Abgleich der *in vitro* Daten mit Patientenblut (*ex vivo*) wurden Tumorzellen unter Einsatz von Dextran, Carboxymethyl-Dextran und Carboxymethyl-Dextran-Partikeln signifikant in der Positivfraktion angereichert. Diese Arbeit unterstreicht damit die Favorisierung von Carboxymethyl-Dextran umhüllten Nanopartikeln zur Tumorzelldepletion.

1. EINLEITUNG

1.1. Krebserkrankungen

Krebs ist im allgemeinen Sprachgebrauch ein Sammelbegriff für eine Vielzahl verwandter Krankheiten, bei denen Körperzellen unkontrolliert wachsen, sich teilen und gesundes Gewebe verdrängen sowie zerstören können. In der Krankheitsentstehung führen unterschiedliche Auslöser zu einer Störung des genetisch geregelten Gleichgewichts zwischen Zellzyklus (Wachstum und Teilung) und programmiertem Zelltod (Apoptose). In der Nomenklatur der malignen Tumoren unterscheidet man zwischen Karzinomen, die ihren Ausgang vom Epithel der Haut, Schleimhaut und Organen haben, und den Sarkomen, die sich von mesenchymalem Gewebe - vor allem Bindegewebe - ableiten. Die aktuellste Abschätzung des Robert-Koch-Instituts weist für das Jahr 2004 insgesamt 436500 Krebsneuerkrankungen in Deutschland aus (Männer 230500, Frauen 206000). Im selben Jahr verursachten Krebskrankheiten 208824 Todesfälle (Männer 110745, Frauen 98079). Seit dem Jahr 1990 ist die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen um fast 30 % angestiegen (RKI 2008). Angesichts dieser hohen Zahlen zu Inzidenz und Mortalität wird deutlich, dass erheblicher Forschungsbedarf auf den Gebieten Tumorentstehung, Metastasenbildung und Tumordiagnostik besteht. Ziel ist es, optimale Therapiestrategien zu entwickeln, um eine Krebserkrankung kurativ behandeln zu können. Dazu trägt auch eine epidemiologische Krebsregistrierung bei. Erst im Jahre 2007 wurde die Erfassung von Krebserkrankungen in allen deutschen Bundesländern gesetzlich verankert (RKI 2008).

1.2. Disseminierte Tumorzellen

Ein Großteil der Krebspatienten verstirbt nicht am Primärtumor, sondern an dessen Metastasen (Fidler 2002, Gupta und Gupta 2005). Es kommt zur Bildung von Tochtergeschwülsten ausgehend von einzelnen Tumorzellen oder kleinen Tumorzellkomplexen, die in der Nähe oder weit entfernt vom Primärtumor unabhängig von diesem proliferieren. Am bedeutendsten ist die aktive Wanderung oder passive Verschleppung von Tumorzellen über vaskuläre Wege - die sogenannte lymphogene und hämatogene Metastasenausbreitung (Wilmanns et al. 2000). Auch intraoperativ ist eine Tumorzellverschleppung möglich (Camara et al. 2006). Der Vorgang der Metastasenbildung ist ein komplexer und dynamischer Prozess, der aus einer Vielzahl von Interaktionen zwischen Tumorzellen und den verschiedenen Komponenten des Wirtsgewebes besteht. Tierexperimentelle Untersuchungen haben früh gezeigt, dass bereits von kleinen Tumoren (1-2 cm im Durchmesser) pro 24 Stunden mehrere Millionen Tumorzellen in die Zirkulation gelangen können (Butler et al. 1975). Die Anzahl dieser so genannten disseminierten Tumorzellen steigt mit zunehmendem Tumorgewicht kontinuierlich an (Liotta et al. 1974). So wurde von Weiss et al. bereits 1982 extrapoliert, dass der Nachweis nur einer einzigen Tumorzelle pro Kubikmillimeter Blut zu einem gegebenen Zeitpunkt etwa 5 Millionen Tumorzellen im Gesamtblut des Patienten entspricht. Genügend disseminierte Tumorzellen können so jeden Einzelschritt des kaskadenartig aufgebauten Metastasierungsprozesses vollziehen und sich über die zunächst nur histologisch erkennbare Mikrometastase zur manifesten Makrometastase entwickeln (Vleems et al. 2003, Pachmann et al. 2008a). Selbst nach Entfernung des Primärtumors und jahrelanger Tumorfreiheit ist eine Metastasenbildung möglich, so dass ein erneuter Anstieg der Tumorzellen im Blut prognostisch verwertbar sein und den Verdacht auf ein Rezidiv erhärten kann (Lobodasch et al. 2007, Pachmann et al. 2008a, Pachmann et al. 2008b). Der negative Einfluss isolierter disseminierter Tumorzellen auf die Überlebensrate konnte bei zahlreichen soliden Tumoren, unter anderem dem Mammakarzinom, demonstriert werden (Braun und Pantel 2000, Diel et al. 1996). In einer Beurteilung von Cristofanilli et al. wird die Menge zirkulierender Tumorzellen vor Beginn einer Behandlung als unabhängiger prognostischer Faktor hinsichtlich der Länge der krankheitsfreien Zeit und der gesamten Überlebenszeit von Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs deklariert (Cristofanilli et al. 2004). Die regelmäßige Kontrolle der zirkulierenden Tumorzellen während der Behandlung

eines Patienten könnte damit ein Therapiemonitoring mit Hinweisen auf Versager ermöglichen. Aus dem Gesagten wird ersichtlich, warum es sinnvoll ist, disseminierte Tumorzellen aus der Blutzirkulation zu entfernen. Nach dem heutigen Stand der Forschung bedeutet die Reduktion der Anzahl an disseminierten Tumorzellen gleichzeitig eine Reduktion des Metastasenrisikos.

1.3. Nanotechnologie

Forschungen auf den Gebieten Nanotechnologie und Nanowissenschaften haben in den letzten Jahren exponentiell zugenommen. Dabei umfasst die Nanotechnologie die gezielte Herstellung, Bearbeitung und Anwendung von Substanzen und Materialien im Nanometerbereich (10^{-9} m) (Kawasaki und Player 2005). Einzigartige Eigenschaften der Nanomaterialien in Optik, Elektronik und Mechanik oder Magnetismus und chemische Reaktionsfähigkeit führten zur Erschaffung neuer Strukturen, Systeme oder Geräte von neuem Nutzen. Nanomaterialien - mit einem Durchmesser, der typischerweise bei 1 bis 100 Nanometern liegt - sind in ihrer Größe mit biologischen Molekülen z.B. Zellen 10-100 μm , Proteinen 5-50 nm oder Genen 2-10 nm vergleichbar (Pankhurst et al. 2003). In der interdisziplinären Nanotechnologie-Forschung verschmelzen deshalb die Fachgebiete der Strukturchemie, Biophysik, Biotechnologie, Zell- und Molekularbiologie, Pharmakologie und Medizin.

1.3.1. Arten von Nanomaterialien

Nanomaterialien können hinsichtlich ihrer geometrischen Form (z.B. Nanoröhren, Nanokristalle, Nanoprismen oder kugelige Nanopartikel) und ihres chemischen Grundgerüsts unterschieden werden. So sind Metalle wie Gold weit verbreitet, denn sie sind stabil, einfach in der Herstellung und durch einzigartige optoelektronische Eigenschaften gekennzeichnet, die ermöglichen, Vorgänge auf molekularer Ebene an Zelloberflächen (Zell-Zell-Kommunikation, Enzymaktivitäten) zu untersuchen (Sperling et al. 2008, Wilson 2008). So führt eine Interaktion Ligand-gekoppelter Goldpartikel mit spezifischen Rezeptoren an der Zielzelloberfläche zur Verklumpung der Nanopartikel, die leicht detektiert werden kann (Liu et al. 2007). Halbleiter-Nanokristalle z.B. CdS emittieren in Abhängigkeit von ihrer Größe nach Anregung

Licht unterschiedlicher Wellenlänge. Sie werden deshalb als optische Markierung in Immunoassays für Proteine, Nukleinsäuren, Bakterien und Toxine eingesetzt (Hu et al. 2001, Nirmal und Brus 1999). Weiterhin werden sie in der Untersuchung und Lokalisierung von Biomolekülen in lebenden Zellen angewandt (Chang et al. 2008, Klostranec und Chan 2006). Magnetische Nanopartikel mit Eisenoxid-Kern sind schon viele Jahre Gegenstand intensiver Forschung und finden Anwendung als Kontrastmittel in der Magnet-Resonanz-Bildgebung (Bonnemain 1998, Martina et al. 2005, Hadjipanayis et al. 2008), Medikamentenverteilung (Dobson 2006, Polyak und Friedmann 2009), Zellseparation (Liberti et al. 2001, El- Boubbou et al. 2007, Schwalbe et al. 2006a, Schwalbe et al. 2006b), Gewebereparatur (Sasaki et al. 2008) und in der Behandlungsmethode der magnetischen Hyperthermie (Jordan et al. 1999, Johannsen et al. 2005). Polymere Strukturen sind für den Wirkstofftransport geeignet, denn sie vereinen die Eigenschaften Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und die Möglichkeit zur Funktionalisierung. Polymer-Nanopartikel bestehen zumeist aus Poly(Milchsäure) oder Poly(Glykolsäure). Ein Einschließen des Wirkstoffs ermöglicht eine gezielte und über einen längeren Zeitraum konstante Wirkstoff-freisetzung (Schnabelrauch und Clement 2007). Kohlenstoff-basierte Strukturen z.B. Carbon-Nanotubes sind hohle, käfigähnliche Röhren, ein- oder zweiwandig aufgebaut, an die Kohlenhydrate, Peptide und Proteine gekoppelt werden können (Lu et al. 2009, Katz et al. 2004). Sie dienen ebenfalls dem Wirkstofftransport.

Allen Nanomaterialien gemeinsam ist das hohe Oberflächen-Volumen-Verhältnis. Um die hohe Oberflächenspannung zu reduzieren neigen sie zur Agglomeration. Die Modifikation ihrer Oberflächenstruktur soll dies vermeiden und damit eine Langzeit-stabilität gewährleisten (Labhasetwar und Leslie-Pelecky 2007). Oberflächen können mit Liganden oder funktionellen Gruppen gekoppelt werden, was den Nanomaterialien spezifische Funktionen und Eigenschaften verleiht.

1.3.2. Einsatzmöglichkeiten von magnetischen Nanopartikeln

Die Magnetische Hyperthermie bezeichnet ein Therapiekonzept, bei dem Tumorzellen durch lokal in den Tumor eingebrachte Wärme geschädigt werden. Prinzip ist die direkte Applikation einer magnetischen Flüssigkeit in die Geschwulst und ihre anschließende Erwärmung in einem magnetischen Wechselfeld. In

Abhängigkeit von Temperatur und Einwirkdauer führt die Behandlung entweder zur direkten Schädigung der Tumorzellen oder macht diese empfindlicher gegenüber einer begleitenden Radio- oder Chemotherapie (Jordan et al. 2007). Beim Magnetic Drug Targeting werden magnetische Nanopartikel als Träger von Arzneistoffen eingesetzt, die gezielt an ihren Wirkort transportiert werden können. So können Partikel reversibel an Zytostatika gebunden, intravenös appliziert und unter Einwirkung eines externen Magnetfeldes im Zielgewebe (Tumor) angereichert werden. Dies eröffnet die Möglichkeit einer zielgerichteten, lokalen und damit nebenwirkungsärmeren und effizienteren Tumorthherapie (Plank et al. 2007). Für die molekulare Bildgebung, das so genannte Bio Imaging, kommen rezeptorspezifische Magnet-Resonanz-Kontrastmittel zur Anwendung. Diese bestehen aus Eisenoxid-Nanopartikeln gekoppelt an Moleküle, die Liganden für Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen darstellen. Dies ermöglicht die Markierung molekularer Strukturen und das damit verbundene, eventuell frühzeitigere Aufdecken von Pathologien (Glöckl und Weitschies 2007). Nach einem ähnlichen Prinzip verläuft das Tumor Cell Targeting, bei dem Antikörper-gekoppelte Nanopartikel an spezifische, vom Tumor exprimierte Strukturen binden und sie damit lokalisierbar machen (Fortina et al. 2007). In der Zell- und Gewebekultivierung im Rahmen des so genannten Tissue Engineering konnten Peptidsequenzen ausgewählter, die Zelladhäsion steuernder Proteine (z.B. Fibronectin, Laminin) als Adhäsionsmoleküle identifiziert und durch deren Kopplung an Nanopartikel spezifische Rezeptoren und folgend intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden (Hersel et al. 2003, Fussell und Cooper 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit werden magnetische Nanopartikel zur Tumorzelldepletion eingesetzt. Dabei werden reine Tumorzell- und Leukozytenkulturen sowie daraus erzeugte Zellgemische mit zuckerumhüllten Nanopartikeln inkubiert. Wagner et al. zeigten, dass magnetische Nanopartikel von Zellkulturzellen und primären Zellen wie Leukozyten zunächst an ihrer Oberfläche angelagert und dann aufgenommen werden (Wagner et al. 2004). Sie liegen intrazellulär in membranumschlossenen Kompartimenten (Endosomen, Lysosomen) vor. Dies ist ein rascher Prozess, der innerhalb von wenigen Minuten zur magnetischen Markierung der Zelle führt und die anschließende magnetbasierte Separation ermöglicht. Hierbei zeigen Tumorzellen in den ersten 4-12 Minuten eine wesentlich schnellere Aufnahmekinetik als Leukozyten

(Schwalbe et al. 2005). Es besteht damit die Möglichkeit, Tumorzellen aus einem Gemisch von Leukozyten und Tumorzellen quantitativ zu entfernen.

1.3.3. Wechselwirkungen von magnetischen Nanopartikeln mit Zellen

In der Theorie sollen magnetische Nanopartikel zukünftig intravenös oder direkt in die Tumorregion verabreicht werden können. Das erfordert deren Sterilität, Stabilität in wässriger Lösung sowie Biokompatibilität und das Verhindern von Aggregationen. Mit einer optimalen Größe von 5-20 nm wäre eine Diffusion der magnetischen Nanopartikel durch Interzellularspalten der Gefäßwände und ein Eindringen in umgebendes Gewebe möglich (Gref et al. 1994, Moghimi et al. 2001). Größere Partikel verbleiben im Blutstrom und werden rasch von Plasmaproteinen umhüllt. Dieser Vorgang der Opsonierung würde zur Eliminierung der Nanopartikel durch Zellen des retikuloendothelialen Systems (z.B. spezifische Gewebsmakrophagen in Leber, Milz und Lymphknoten) führen (Davis 1997). Durch Modifikation der Partikeloberfläche versucht man diesen Abwehrschritt zu umgehen. Hydrophile Oberflächenstrukturen - in der Literatur weit verbreitet sind Dextranderivate, Polyethylenglycol oder Polyethylenoxid - verhindern wirkungsvoll die Opsonierung und erlauben damit längere Zirkulationszeiten der Partikel im Blutstrom (Brigger et al. 2002, Shen et al. 1996, Portet et al. 2001). Neben den chemischen Eigenschaften der Nanomaterialien spielt die Kopplung an spezifische Zellrezeptoren eine entscheidende Rolle. Nanopartikel können Molekülgruppen oder Proteine tragen, die von Oberflächenrezeptoren einer Körperzelle spezifisch erkannt werden. Eine Vielzahl von möglichen Liganden könnte zur Markierung einer Zelle mit Antikörpern, Peptiden, Polysacchariden oder Arzneimitteln dienen (Cell Targeting) und unter Umständen pathologische Strukturen wie Tumore frühzeitiger diagnostizierbar machen (Berry et al. 2004, Wickline und Lanza 2003, Kawashima 2001). Magnetische Nanopartikel werden höchstwahrscheinlich via Endozytose oder Pinozytose in die Zelle aufgenommen. Endozytose - der spezifischere Vorgang von beiden - verläuft Clathrin-vermittelt in den Teilschritten Membraninvagination, Ausbildung von Clathrin-Grübchen, Vesikelabschnürung und Vesikeltransport ins Zytosol (Schafer 2002). Dies bedarf einer komplexen Maschinerie aus Kontrollproteinen und fein abgestimmten Regulationsschritten mit dem Zytoskelett. Mit der Kopplung an zellpenetrierende Proteine (maximale Größe von 30 Aminosäuren) können

Nanopartikel einfach die Zellmembran überwinden und in großen Mengen in bestimmten Zielzellen angereichert werden (Lundberg und Langel 2003).

1.4. Ziele dieser Arbeit

Die Hüllstruktur der magnetischen Nanopartikel ist von herausragender Bedeutung. Sie ist Voraussetzung für die zellspezifische Interaktion der Partikel mit Tumorzellen und Leukozyten und trägt zur ihrer Biokompatibilität bei. In Abhängigkeit der verwendeten Polysaccharidhülle kommt es zur schnelleren Interaktion von Tumorzellen mit Nanopartikeln. Diese rasche magnetische Markierung ermöglicht die Abtrennung von Tumorzellen gegenüber Leukozyten mittels magnetischer Zellseparation. Dieses Verfahren wird genutzt, um Tumorzellen aus einem künstlich erzeugten Zellgemisch kultivierter Tumorzellen und Leukozyten zu entfernen. Aus peripherem Blut von Krebspatienten wird damit die Eliminierung disseminierter Tumorzellen *ex vivo* im experimentellen Maßstab möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Hüllstrukturen der magnetischen Nanopartikel auf die Diskriminierung von Tumorzellen und Leukozyten untersucht. Dabei galt es Antworten auf folgende Fragen zu finden:

- Trägt die Art der Dextran-Derivatisierung zur Zellspezifität bei?
- Kann die verlangsamte Kinetik der Leukozyten durch andere Dextranderivate noch verstärkt werden?
- Führt die Inkubation von Tumorzellen mit Nanopartikeln zum erhöhten Zelluntergang?
- Können erhaltene Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen auf Patientenblut (*ex vivo*) übertragen werden?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Geräte und Chemikalien

Tabelle 1: verwendete Geräte und Hilfsmittel

Gerät/ Hilfsmittel	Bezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer	BD FACSCalibur™ Durchflusszytometer	Becton Dickinson
Inkubator		Heraeus Instruments
Kamera	AxioCamHRc	Zeiss
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss
Monovetten zur Blutentnahme	EDTA KE/9 ml NH ₄ - Heparin	Sarstedt Sarstedt
Software zur Aufnahme und Analyse von Daten der Durchflusszytometrie	BD Cell Quest Pro	BD Biosciences
Sterilwerkbank	HERAsafe	Heraeus Instruments
Tabellenkalkulation	Excel	Microsoft
Thermomixer	Thermomixer 5437	Eppendorf
Ultraschallsonde	Bandelin Sonoplus HD 2200	Bandelin Electronic
Wasserbad		Memmert
Zellkulturflaschen (75 cm ² Wachstumsfläche)		Greiner Bio-one
Zellseparatoren	SuperMACS™ II Separator	Miltenyi Biotec
Zellseparationssäulen	MACS® Separation Column MS	Miltenyi Biotec
Zellzählgerät	Coulter Z2 Particle Count & Size Analyser	Beckman Coulter
Zentrifugen	Centrifuge 5315R	Eppendorf
	Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments
	Centrifuge 5417R	Eppendorf
	Centrifuge 5810R	Eppendorf

Tabelle 2: verwendete Chemikalien und Nährmedien

Chemikalie	Hersteller
Annexin V-FITC	BD Pharmingen™
Antibiotic/ Antimycotic	Gibco® (Invitrogen)
Anti-HEA (EpCAM)-FITC	Miltenyi Biotec
BD FACS Clean Solution	Becton Dickinson
BD FACSToFlow™	Becton Dickinson
BD FACSRinse™	Becton Dickinson
BD Pharmingen™ Annexin V Binding Buffer	BD Pharmingen™
Coulter Isoton II Diluent	Beckman Coulter
CD 45-PE	Miltenyi Biotec
DMEM + GlutaMAX™-I (Zellkulturmedium)	Gibco® (Invitrogen)
EDTA	Sigma®
Erythrozytenlyse (EL)-Puffer	Qiagen
PBS	Gibco® (Invitrogen)
Penicillin/Streptomycin	Gibco® (Invitrogen)
Trypsin-EDTA	Gibco® (Invitrogen)

Tabelle 3: verwendete Materialien zur Umhüllung von Nanopartikeln

Hüllstoff	Hersteller
Dextran	Fluka
Carboxy-Dextran	K. Aurich (Greifswald)
Carboxymethyl-Dextran	Innovent e. V.
Carboxymethyl-Cellulose	Innovent e. V.

Tabelle 4: verwendete Nanopartikel von Innovent e.V.

Hüllstoff	Hersteller	Bezeichnung	Größe [nm]	Zeta-potential [mV]
Amino-Dextran	Innovent e.V.	V 200	~ 470	24
Carboxymethyl-Chitosan	Innovent e.V.	V 207	~ 93	44
Carboxymethyl-γ-Cyclodextrin	Innovent e.V.	V 208/2	~ 134	-32
Carboxymethyl-β-Cyclodextrin	Innovent e.V.	V 209	~ 129	35

2.2. Zellkultur

Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.1. Zelllinie MCF7

Die Zelllinie MCF7 wurde 1973 aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Kaukasierin mit metastasiertem Mammakarzinom etabliert (Brooks et al. 1973, Soule et al. 1973). MCF7-Zellen wachsen adhärent als Monolayer und werden mit DMEM plus 10% fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert.

2.2.2. Kultivierung und Passagieren der Zellen

Jeden zweiten bis dritten Tag wurden die Zellen mikroskopisch begutachtet, Aussehen und Wachstumsverhalten bewertet und eine mögliche Infektion ausgeschlossen. Bei nicht konfluentem Zellrasen erfolgte lediglich ein Mediumwechsel, bei dichtem Zellrasen wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:5 geteilt und in neue Zellkulturflaschen überführt. Zu diesem Zweck wurde das alte Medium verworfen, der Zellrasen vorsichtig mit 5 ml PBS-Puffer gespült und anschließend mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung einige Minuten inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Danach erfolgte die Zugabe von Medium, um die Trypsinwirkung zu neutralisieren, die Aufteilung in neue Zellkulturflaschen und die Auffüllung mit Medium bis zu einem Gehalt von 20 ml pro Kulturgefäß. Wurden Zellen zur Versuchsdurchführung benötigt, erfolgte keine Aufteilung in neue Zellkulturflaschen sondern Zentrifugation (1000 U/min, 5 min), Verwerfen des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in 2 ml PE-Puffer.

2.2.3. Bestimmung der Zellzahl

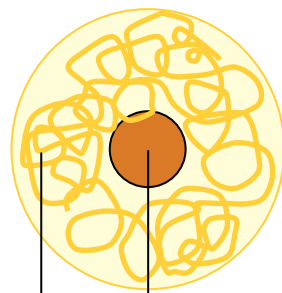
Hierzu wurden 50 µl der vorhandenen Zellsuspension mit 20 ml Isoton (Verdünnungsfaktor 1:400) gut gemischt und in den Coulter® Z2 (Beckman Coulter) eingesetzt. Dieses Gerät misst die Zellzahl und berechnet diese pro Milliliter als Mittelwert aus 2 Messungen.

2.3. Leukozytenisolierung aus Vollblut

Venöses Vollblut gesunder Spender konnte durch Punktion einer peripheren Vene gewonnen werden. Dabei kamen vorwiegend Monovetten mit NH₄-Heparin-Zusatz (Sarstedt) zum Einsatz. 8 ml der Blutprobe wurden in ein Falcon überführt, 40 ml Erythrozytenlysepuffer (Qiagen) zugefügt und verschlossen liegend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (1200 U/min, 10 min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 15 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und erneut 5 min liegend inkubiert. Nach wiederholter Zentrifugation (1200 U/min, 5 min) und Abnahme des Überstandes erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in 2 ml PE-Puffer. Abschließend Bestimmung der Zellzahl nach dem in 2.2.3. genannten Prinzip und zügige Weiterverarbeitung der isolierten Leukozyten.

2.4. Magnetische Nanopartikel

In dieser Arbeit kamen Partikel, bestehend aus einem magnetischen Eisenoxid-Kern (Magnetit/Maghemit, durchschnittliche Größe von 5 nm) und einer spezifischen Polysaccharidhülle (z.B. Carboxymethyl-Dextran wie in Abb.1), zum Einsatz.



Core

Iron oxide → magnetite/maghemite; TEM-size between 5 and 15nm

Shell

Carboxymethyl-dextran (without antibodies)

Abbildung 1: Modell eines magnetischen Nanopartikels aus Schwalbe M, Buske N, Vetterlein M, Höffken K, Pachmann K, Clement JH. 2006a. The Carboxymethyl Dextran Shell is an Important Modulator of Magnetic Nanoparticle Uptake in Human Cells. Z. Phys. Chem. 220: 125-131.

Wagner et al. zeigten 2004, dass magnetische Nanopartikel von Zellkulturzellen und primären Zellen wie Leukozyten aufgenommen werden und dann intrazellulär in membranumschlossenen Kompartimenten (Endosomen, Lysosomen) vorliegen (Abb. 2). Dies ist ein rascher Prozess, der innerhalb von wenigen Minuten zur magnetischen Markierung der Zelle führt und die anschließende magnetbasierte Separation ermöglicht. Hierbei zeigen Tumorzellen in den ersten 4-12 Minuten eine wesentlich schnellere Aufnahmekinetik als Leukozyten (Schwalbe et al. 2005). Es besteht damit die Möglichkeit, Tumorzellen aus einem Gemisch von Leukozyten und Tumorzellen quantitativ zu entfernen. Hohe Tumorzellausbeute und geringer Lymphozytenverlust stellen die zentralen Ziele dar. Neben der Inkubationszeit ist die Partikelhülle von herausragender Bedeutung. Es wurde gezeigt, dass Partikel ohne Polysaccharidhülle sowohl Tumorzellen als auch Leukozyten gleichschnell und in hohem Ausmaß markierten (Schwalbe et al. 2006a). Die Verwendung von Carboxymethyl-Dextran als Hüllstruktur führte zur zellspezifischen Markierung der Tumorzellen und zu einer Erweiterung des Zeitfensters, in dem deutlich mehr Tumorzellen als Leukozyten im Magnetfeld zurückgehalten werden (Schwalbe et al. 2006a, Schwalbe et al. 2006b). Während die Änderung von Temperatur, pH-Wert und die Zugabe von Glucose keinen Einfluss auf die Tumorzellanreicherung zeigte, führte die Zugabe geringer Mengen von Blutplasma (0,5-2,5 %) zu einer

dramatischen Reduktion der diskriminierten Leukozyten (Schwalbe et al. 2005). Untersuchungen an Blutproben von Patienten mit epithelialen Tumoren bestätigten die *in vitro* Ergebnisse auf eindrucksvolle Weise: 99 % der disseminierten Tumorzellen in einer Blutprobe konnten mittels magnetischer Zellseparation aus der isolierten Leukozytenfraktion entfernt werden (Clement et al. 2006, Schwalbe et al. 2006). Um eine anschließende Retransfusion der Leukozyten zu ermöglichen gilt es, schädigende Einflüsse der Nanopartikel auf weiße Blutzellen, vor allem Lymphozyten, zu minimieren. Die Partikelhülle wird dabei genutzt, um Biokompatibilität hervorzurufen (Alexiou et al. 2006). In Untersuchungen zum Einfluss des strukturellen Aufbaus der Polysaccharidhülle konnten Wotschadlo et al. 2009 zeigen, dass Polysaccharide, die eine (λ)alpha-1-4-Verknüpfung aufweisen, wesentlich besser zur Aufnahme der Nanopartikel beitragen als (β)beta-1-4-verknüpfte Zuckerderivate.

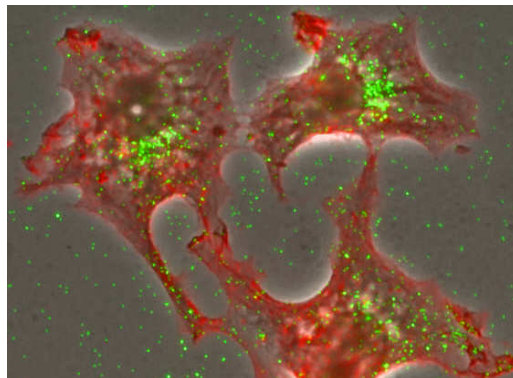


Abbildung 2: Kulturzellen MCF7 (Brustkrebszelllinie) mit intrazellulär aufgenommenen Polystyrol-Nanopartikeln (100 nm im Durchmesser, fluoreszenzgekoppelt) mit freundlicher Genehmigung von Christiane Rickmann

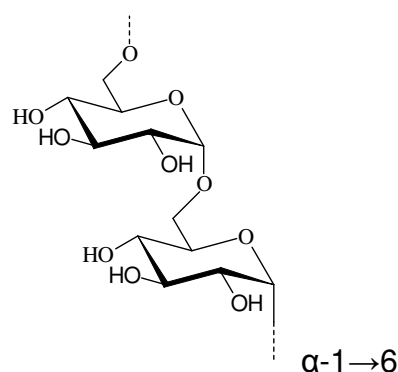
2.4.1. Neuumhüllung von magnetischen Nanopartikeln

Magnetische Nanopartikel zeigen die beschriebene zellspezifische Aufnahme nur, wenn sie eine Polysaccharidhülle besitzen. Nicht umhüllte verhalten sich ebenso wie „gealterte“ Partikel, das heißt sie werden sowohl in Tumorzellen als auch in Leukozyten in gleichem Maße stark aufgenommen, was eine Unterscheidung der Zellen unmöglich macht (Schwalbe et al. 2006a). Aus diesem Grunde ist eine wiederholte Neuumhüllung erforderlich. Es werden 50 mg des jeweiligen

Polysaccharides (Dextran, Carboxy-Dextran, Carboxymethyl-Dextran, Carboxymethyl-Cellulose) in 300 µl Leitungswasser vollständig gelöst, 1 ml „alte“ Nanopartikellösung zugegeben und 2 Stunden bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert. Danach erfolgt die Überführung in ein Becherglas, Zugabe von 10 ml Leitungswasser, kräftiges Durchmischen und die Sedimentation der Partikel auf einem starken Magneten. Nach Abnahme des Überstandes wird der Waschschrift wiederholt. Abschließend werden die sedimentierten, nun neu umhüllten Nanopartikel mit Leitungswasser auf ein Volumen von 1 ml gebracht und mögliche Partikelaggregationen mittels Ultraschall (3-5 sec, 30-40 Watt ohne Intervall, auf Eis) gelöst. Magnetische Nanopartikel wurden im Kühlschrank gelagert und kurz vor ihrem Einsatz kräftig geschüttelt beziehungsweise leicht gevortext.

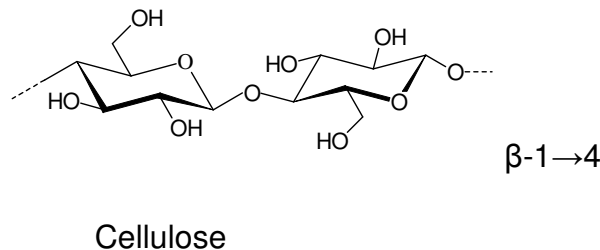
2.4.2. Hüllsubstanzen der eigenumhüllten Nanopartikel

Dextrane sind hochmolekulare, neutrale, wenig verzweigte Biopolysaccharide. Sie sind ausschließlich aus Glukose-Einheiten aufgebaut (Homoglykane) und α -1→6-glykosidisch verknüpft. Natürliche Dextrane besitzen Molekülmassen zwischen 15.000 und 50.000.000 Da und werden von Bakterien der Gattung *Leuconostoc* (*L. mesenteroides* und *L. dextranicum*) hergestellt. Weite Verbreitung finden Dextrane in der chemischen und kosmetischen Industrie. Durch Derivatisierung mit Carboxylgruppen (R-COOH) und Carboxymethylgruppen (R-CH₂-COOH) entstehen die Abkömmlinge *Carboxy-Dextran* und *Carboxymethyl-Dextran*.



Dextran

Cellulose ist ein unverzweigtes Polysaccharid, welches aus mehreren hundert bis zehntausend β -Glucose-Molekülen, β -1 \rightarrow 4-glykosidisch verknüpft, besteht. Es bildet sehr lange Ketten. Durch Quervernetzung der einzelnen Stränge über Wasserstoffbrücken wird eine hohe Zugfestigkeit erreicht. Cellulose stellt den Hauptbestandteil von pflanzlichen Zellwänden dar und hat große Bedeutung als Ballast- und Zusatzstoff in der Lebensmittelindustrie.



2.4.3. Hüllsubstanzen der Nanopartikel von Innovent e.V.

Es standen Lösungen von folgenden gebrauchsfertig umhüllten magnetischen Nanopartikeln zur Verfügung:

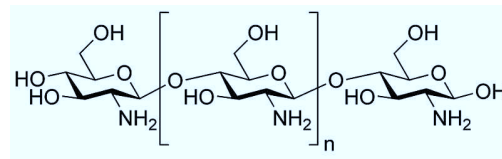
Tabelle 5: verwendete Nanopartikel von Innovent e.V.

Hersteller- Bezeichnung	Hüllstoff	Größe [nm]	Zetapotential [mV]
V 200	Amino-Dextran	~ 470	24
V 207	Carboxymethyl-Chitosan	~ 93	44
V 208/2	Carboxymethyl- γ -Cyclodextrin	~ 134	-32
V 209	Carboxymethyl- β -Cyclodextrin	~ 129	35

Amino-Dextran bezeichnet ein Dextran-Derivat mit Aminogruppen ($-\text{NH}_2$).

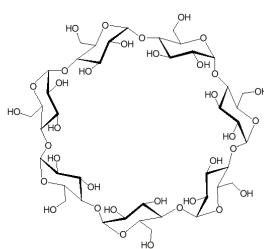
Chitosan ist ein natürlich vorkommendes Polyaminosaccharid, welches sich vom Chitin ableitet. Wie dieses besteht es aus β -1 \rightarrow 4-glykosidisch verknüpften N-Acetylglucosaminresten. Krabbenschalen bilden den Ausgangsstoff zur Chitosan-Herstellung. Dazu werden die Acetylgruppen des Chitins chemisch oder enzymatisch abgespalten. Da es sich beim Chitin und beim Chitosan um Biopolymere handelt, kommen diese beiden Substanzen sowohl mit verschiedenen Molekulargewichten als auch mit unterschiedlicher Anzahl an Acetylgruppen vor. Mit den Eigenschaften schadstoffbindend, antimikrobiell und ungiftig findet Chitosan weite Verbreitung in der

Ernährungs- und Kosmetikindustrie, als Arzneimittelträger, als Wundauflage und zur Abwässerklärung.



Chitosan

Cyclodextrine stellen Abbauprodukte von Stärke dar und gehören zu den zyklischen Oligosacchariden. Sie bestehen aus α -1 \rightarrow 4-glykosidisch verknüpften Glucosemolekülen. Dadurch entsteht eine Ringstruktur mit einem zentralen Hohlraum. Allen niederen Cyclodextrinen gemeinsam ist die hydrophobe Kavität im Innern und die polare Außenfläche (Abb. 3). Dadurch sind Cyclodextrine in der Lage, sogenannte Einschlussverbindungen mit apolaren organischen Verbindungen zu bilden. Diese Fähigkeit machen sie zu einem immer wichtigeren Gegenstand der pharmazeutischen Forschung, da die Komplexe in der Regel besser wasserlöslich sind als die reinen Pharmazeutika.



β - Cyclodextrin

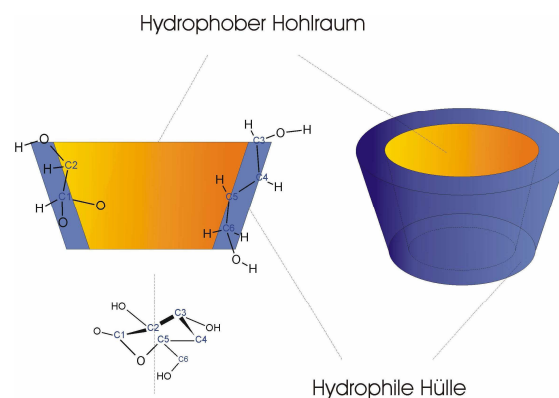


Abbildung 3: Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus der Cyclodextrine aus Gröger M, Kretzer EK, Woyke A. Reader „Cyclodextrine“. 2001. Science Forum an der Universität Siegen, Didaktik der Chemie.

Nach Anzahl der verknüpften Glukoseeinheiten lassen sich unterschiedliche Cyclodextrine mit differenten Eigenschaften beschreiben (Tab. 6):

Tabelle 6: Stoffeigenschaften der natürlichen Cyclodextrine (CD) aus Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. 2007. Adv. Drug Deliv. Rev. 59, Nr. 7 645-666.

Eigenschaften	α -CD	β -CD	γ -CD
Zahl der Glucosemoleküle	6	7	8
Molekulargewicht (g/mol)	972	1135	1297
Innendurchmesser (Å)	5,7	7,8	9,5
Höhe des Hohlraums (Å)	7,8	7,8	7,8
Wasserlöslichkeit (g/l) bei 25 °C	145	18,5	232

Neben der verbesserten Löslichkeit werden die eingeschlossenen Wirkstoffe unter anderem gegen Oxidation stabilisiert, ihre Bioverfügbarkeit wird erhöht, nachteilige Geruchs- oder Geschmackseffekte können aufgehoben werden. Bedeutsam ist auch, dass man über die Cyclodextrin-Komplexe einiger Wirkstoffe eine sukzessive Abgabe über einen längeren Zeitraum erreichen kann. Bei intravenöser Gabe geeigneter Cyclodextrinderivate verringern sich das Dosiervolumen und Irritationen. Letzteres ist besonders bei antikanzerogenen Reagenzien bedeutsam, die leicht zu Venenentzündungen und Schmerzen an der Injektionsstelle führen können (Klein und Zöller 2008).

2.5. Magnetische Zellseparation (MACS)

MACS = „**M**agnetic **A**ctivated **C**ell **S**orting“ (Miltenyi Biotec GmbH) bezeichnet ein Verfahren zur Zellseparation. Es bedient sich submikroskopisch kleiner, superparamagnetischer Partikel (MACS-MicroBeads), an die monoklonale Antikörper gegen ein spezielles Zelloberflächenantigen gekoppelt sein können. Diese MicroBeads haben keinen Einfluss auf Struktur-, Funktions- oder Aktivitätszustand der markierten Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit werden Zellen durch die endozytotische Aufnahme von zuckerumhüllten magnetischen Nanopartikeln markiert. Auf den Einsatz von Antikörpern konnte somit verzichtet werden. Bei der Passage durch eine mit ferromagnetischen Kügelchen bestückte Säule, die in ein permanent starkes Magnetfeld eingebracht wird, werden markierte Zellen

zurückgehalten, während Zellen, die keine Partikel aufnehmen, die Säule ungehindert durchlaufen können. Sie werden im Folgenden als Negativfraktion bezeichnet. Nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld können die magnetisch markierten, zurückgehaltenen Zellen als Positivfraktion eluiert werden (Abb. 4).

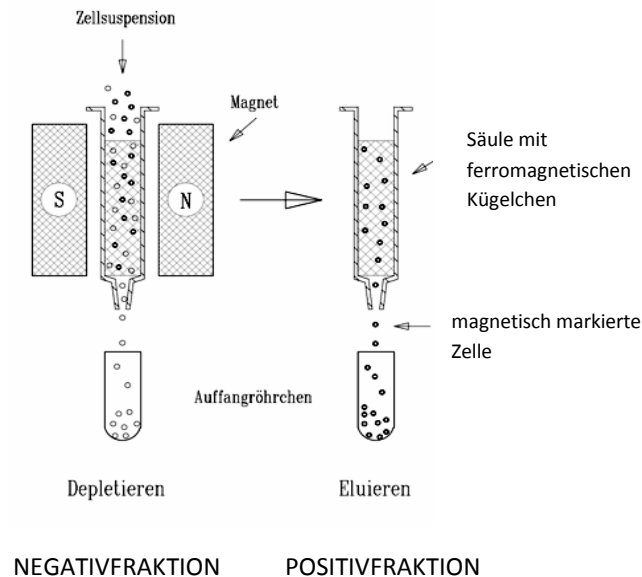


Abbildung 4: modifiziert aus Göttlinger C und Radbruch A. 1993. Methoden der Zelltrennung. mta 8, 530-536.

Separationsstrategie ist demnach eine Positivselektion, das heißt die gewünschten Zielzellen werden magnetisch markiert und isoliert.

2.5.1. Magnetische Markierung und Sortierung - Aufnahme einer Kinetik

Um Berechnungen bezüglich der Markierung von Zellen zu ermöglichen, ist der Einsatz einer definierten Anzahl von Zellen pro Einzelkinetik nötig. Dies sind bei Leukozyten $2,5 \times 10^6$ Zellen und bei Tumorzellen (MCF7) 1×10^6 Zellen pro Versuchsansatz. Nach Bestimmung der Zellzahl am Coulter® Z2 wird ein oben genannter Zellzahl entsprechendes Aliquot entnommen, in ein Eppendorf Tube überführt und mit PE auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt. Anschließend werden 2,5 µl der magnetischen Nanopartikellösung in den Deckel des Tubes pipettiert, die Proben verschlossen und in einem Wärmeblock bei 37°C gelagert. Im

nächsten Schritt erfolgt die Vorbereitung des MACS-Systems. Eine Separationssäule (MS-Säule) wird ins Magnetfeld des SuperMACS™ II-Separators (Abb. 5) eingesetzt und zunächst mit 500 µl PE-Puffer equilibriert. Anschließend wird ein Röhrchen zum Auffangen der Negativfraktion eingespannt. Erst jetzt werden alle vorbereiteten Proben zeitgleich geschüttelt, so dass sich Nanopartikel und Zellsuspension vermischen und die Uhr gestartet. Nach Ablauf einer definierten Inkubationszeit (0, 4, 8, 12, 16, 20 min) wird eine Probe aus dem Thermomixer entnommen, erneut geschüttelt und auf die vorbereitete Säule pipettiert. Während der folgenden Passage der Flüssigkeit haften magnetisch markierte Zellen am Säulenmaterial, wohingegen Zellen ohne Nanopartikel-Aufnahme als negative Fraktion im Durchfluss aufgefangen werden. Nach einmaligem Waschen der Säule mit 500 µl PE-Puffer wird diese aus dem Magnetfeld entfernt, ein neues Röhrchen untergespannt und die zurückgehaltenen Zellen durch Zugabe von 1000 µl PE-Puffer mit Hilfe eines Druckstempels eluiert (Positivfraktion). Abschließend erfolgt die Bestimmung der Zellzahl in Positiv- und Negativfraktion gemäß 2.2.3. sowie die rechnerische Auswertung (Beispiel im Anhang).



Abbildung 5: SuperMACS™ II Separator aus Column_Decision_Flyer Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.6. Durchflusszytometrie (FACS)

FACS= „**F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orting“ (Becton Dickinson, USA) beschreibt den Vorgang der Analyse von Zelleigenschaften durch Emission von Streulicht oder Fluoreszenzimpulsen als Reaktion auf Laserbestrahlung beim Durchfließen einer Glaskapillare (<http://www.med-serv.de/ma-2832-facs.html>). Es werden dabei primär

keine Zellen sortiert, sondern Eigenschaften wie Zellgröße, Zellmembrandicke oder Antikörperbesatz analysiert. In der vorliegenden Arbeit dient die Durchflusszytometrie der Unterscheidung von Zielzellen in einem Zellgemisch aufgrund von unterschiedlicher Zellgröße, Zellgranularität und Eigenfluoreszenz. Grundlage einer FACS-Analyse ist eine Einzelzellsuspension, deren Zellen einzeln einen fokussierten Laserstrahl passieren und dadurch angeregt werden. Das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht wird separat detektiert. Die Streuung des Lichtes ermöglicht die Trennung der Zellen nach Größe im *Forward Scatter* (FCS) und Granularität im *Side Scatter* (SSC). Mit diesen beiden Parametern lassen sich zum Beispiel die Leukozytenfraktionen des Blutes bereits ungefärbt gut unterscheiden (Abb. 6, 7).

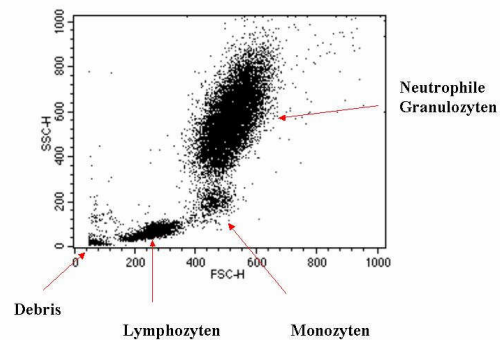
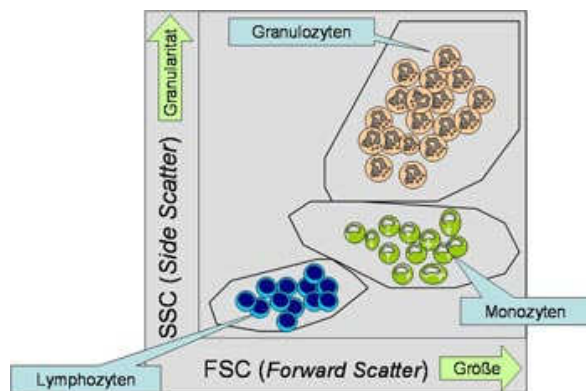


Abbildung 6 links: Charakterisierung von ungefärbten Zellen anhand der Lichtstreuung (Dot Plot). Große Zellen befinden sich rechts in der Abbildung. Granuläre Zellen befinden sich oben. Granulozyten (große Zellen mit hoher Granularität) werden demnach rechts oben angezeigt. aus http://www.antikoerper-online.de/images/news/resources_FACS_1_de.jpg

Abbildung 7 rechts: FACS-Darstellung der Leukozytenpopulationen, Charité Universitätsmedizin Berlin, gemeinsame Einrichtung von Freier Universität und Humboldt-Universität zu Berlin, Campus Buch; www.rrk-berlin.de/nephrologie/pics/durch3.png

Durch den zusätzlichen Einsatz von fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder Fluoreszenzfarbstoffen werden Untersuchungen zur Expression von Oberflächen- bzw. intrazellulären Molekülen ermöglicht (Tab. 7).

Tabelle 7: Absorptions- und Emissionsmaxima einiger Fluorochrome

Fluorochrom		Absorptions- maximum [nm]	Emissions- maximum [nm]
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	495	519
PE	R-Phycoerythrin	480	578
PI	Propidiumiodid	500	650

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms CELL Quest Pro (Becton Dickinson, USA). Die Zellanalysen wurden als Häufigkeitsverteilung entweder in Form eines Histogrammes oder als Dot Plots (Punktwolken) dargestellt. Weiterhin ermöglicht das Programm Regionen von Zellpopulationen zu definieren (Gate setzen) und spätere Berechnungen auf diese Populationen zu beschränken.

2.6.1. Apoptose- Assay

Dieses durchflusszytometrische Verfahren dient der Überprüfung der Zellvitalität. Im Rahmen dieser Arbeit kam es bei der Langzeitinkubation von Tumorzellen (MCF7) mit magnetischen Nanopartikeln (3.4.) zur Vitalitätskontrolle der Kulturzellen zum Einsatz. Für die Färbung der Zellen mit den Apoptose- und Nekrosemarkern Annexin V und Propidiumiodid (PI) wurden 2×10^5 Zellen eingesetzt. Annexin V ist ein kalziumabhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserin. Daran kann es nur binden, wenn infolge von Apoptose die Membransymmetrie der Zelle zerstört und Phosphatidylserin an die Zelloberfläche transloziert wird. Propidiumiodid dringt durch beschädigte Plasmamembranen in Zellen ein und färbt somit nekrotische Zellen an. In einem ersten Schritt wurden nach Separation der Zellen PE- oder Mediumreste abzentrifugiert (1000 U/min, 5 min), verworfen und die Zellsuspension zweimal mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 100 µl Annexin V Binding Buffer aufgenommen und jeweils 5 µl der oben genannten Farbstoffe hinzupipettiert. Die Ansätze wurden 15 min in Dunkelheit inkubiert, mit 400 µl Annexin V Binding Buffer aufgefüllt und innerhalb einer Stunde analysiert.

2.7. Laser Scanning Cytometrie (LSC)

Das Verfahren der Laser Scanning Cytometrie dient dem quantitativen Nachweis disseminierter Tumorzellen im Blut Erkrankter. Grundlage ist der Nachweis epithelialer Zellantigene mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper (Abb. 8):

- Anti-HEA (EpCAM)-FITC dient der grünen kappenförmigen Fluoreszenzmarkierung EpCAM-positiver Zellen (Tumorzellen)
- CD 45-PE führt zur orangenen Fluoreszenzmarkierung CD 45-positiver Zellen (Leukozyten)

Das Epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) ist ein Epithelzellmarker, welcher Funktionen bei der Zelladhäsion, -migration, -differenzierung und bei der Metastasierung übernimmt. Im gesunden Organismus sind EpCAM-positive Zellen nicht im peripheren Blut nachweisbar. Besondere Bedeutung hat der Nachweis zirkulierender, EpCAM-positiver Zellen als Marker für Diagnose und Therapie-monitoring von Mammakarzinomen (Pachmann et al. 2008a, Pachmann et al. 2008b). In Zusammenarbeit mit Conny Jörke wurde Blut von Brustkrebspatientinnen der Universitätsfrauenklinik Jena aufgearbeitet (Protokoll im Anhang), per LSC analysiert und die Anzahl der Tumorzellen pro ml Blut bestimmt. Diese detektierte „Tumorzelllast“ bildete die Grundlage weiterer Versuche und Berechnungen.

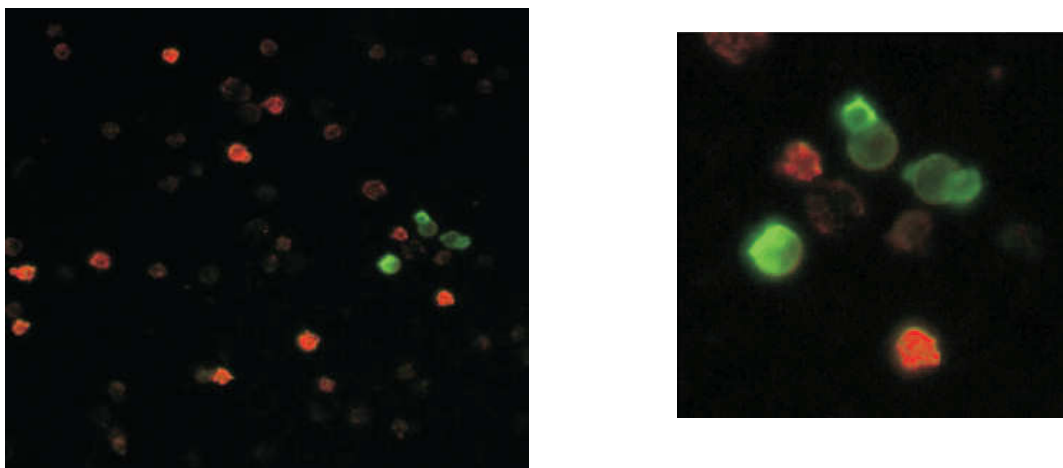


Abbildung 8: die orange-fluoreszierenden CD 45-positiven Zellen (Leukozyten) sind gut von den EpCAM-positiven Zellen mit kappenförmiger grüner Fluoreszenzmarkierung (Tumorzellen) zu unterscheiden; links in 250-facher, rechts in 500-facher Vergrößerung

aus Camara et al. 2008. Monitoring the Response of Circulating Epithelial Tumor Cells (CETC) to Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Allows Detection of Patients at Risk of Early Relapse. J Clin Oncol 2008, 26 (8): 1208-1215.

2.8. Statistische Methoden

In vitro Experimente wurden 3-mal unter annähernd gleichen Bedingungen durchgeführt und aus diesen Daten Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. *Ex vivo* wurden Blutproben von insgesamt 12 Patienten analysiert. Zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede kam der t-Test zur Anwendung. Als Signifikanzniveau wurde, wie allgemein üblich, 5 % festgelegt. Graphiken wurden unter Zuhilfenahme von Microsoft Excel erstellt.

3. ERGEBNISSE

Zuckerumhüllte magnetische Nanopartikel werden in Tumorzellen als auch in Leukozyten aufgenommen. Dieser Vorgang ist in parallel verlaufende Teilschritte untergliedert. Zunächst kommt es zur Anlagerung der umhüllten Partikel an die Zelloberfläche der Zielzelle. Durch Wechselwirkungen zwischen Zuckerhülle und Plasmamembran haften die Magnetpartikel, werden endozytotisch aufgenommen und liegen letztendlich in membranumschlossenen Kompartimenten (Phagosom, Lysosom) intrazellulär vor (Wagner et al. 2004). Im Folgenden wird deshalb weitestgehend von Beladung der Zielzellen gesprochen. An jeder Zielzelle entsteht damit ein Gradient der Partikelbeladung mit an der Zelloberfläche angelagerten und/ oder bereits intrazellulär aufgenommenen Partikeln, der darüber entscheidet, wann das magnetische Potential der Zelle groß genug ist, um im Magnetfeld in der Säule des Magnet-Separators zurückgehalten zu werden. Ist dies der Fall, können die so magnetisch markierten, zurückgehaltenen Zellen als Positivfraktion isoliert werden.

3.1. Neuumhüllung und Testung von magnetischen Nanopartikeln mit spezifischen Zuckerderivathüllen

3.1.1. Interaktionskinetiken mit reinen Tumorzell- und Leukozytenkulturen

Nach Neuumhüllung der magnetischen Nanopartikel mit Dextran, Carboxy-Dextran, Carboxymethyl-Dextran und Carboxymethyl-Cellulose wurden Inkubationsversuche an Tumorzellen (MCF7) und Leukozyten getrennt durchgeführt. Es erfolgte die magnetische Zellseparation und Erstellung der Kinetiken nach 4, 8, 12, 16 (bei Leukozyten zusätzlich 20) Minuten Inkubationszeit. Nach Zellzählung fanden Berechnungen zum Anteil der verschiedenen Zellen an Positiv- und Negativfraktion statt. Eine vergleichende Darstellung der verschiedenen Partikel (Abb. 9, links Positivfraktion, rechts Negativfraktion) veranschaulicht die Separationsunterschiede.

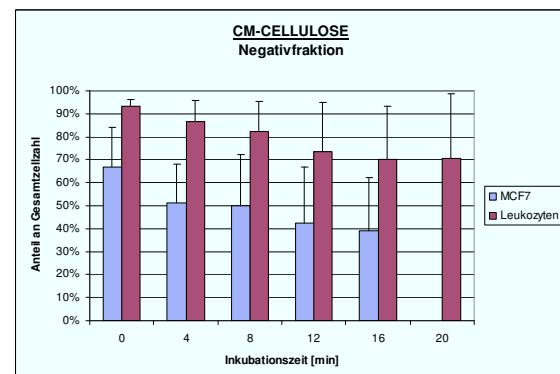
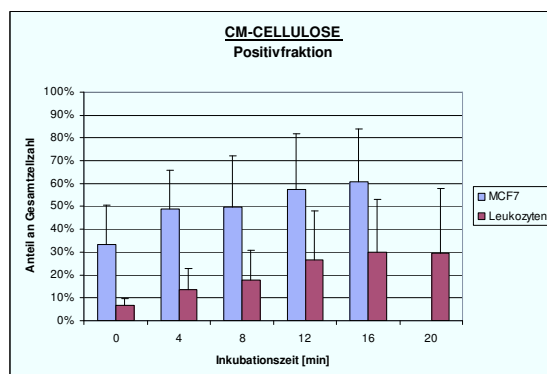
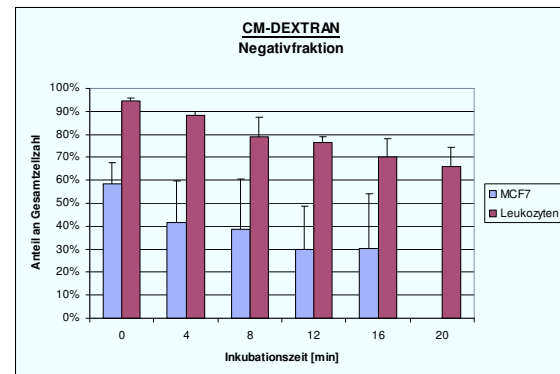
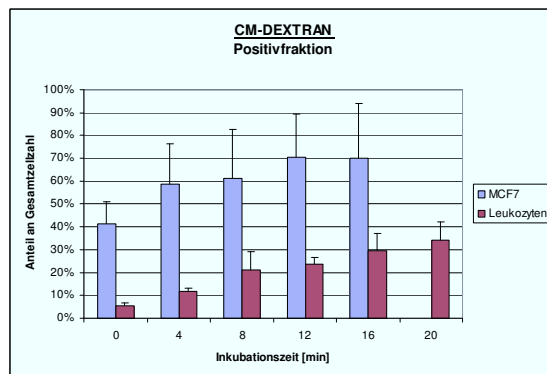
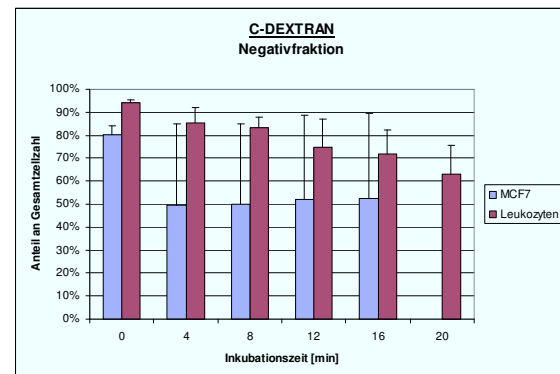
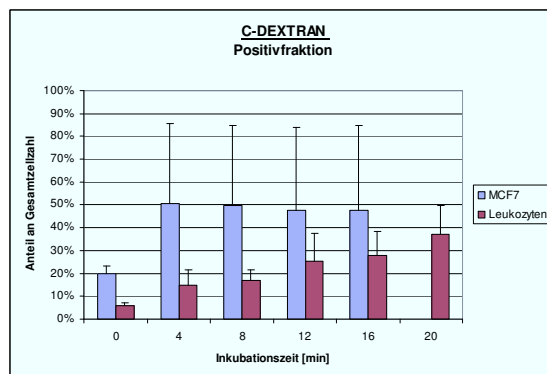
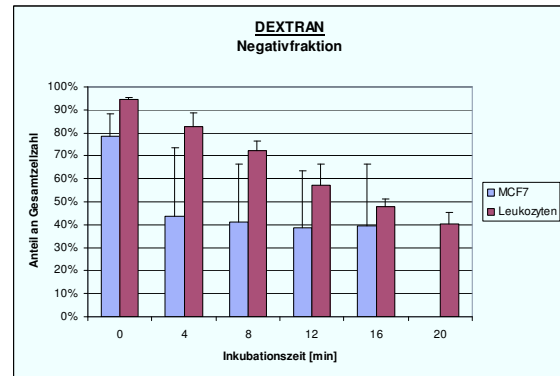
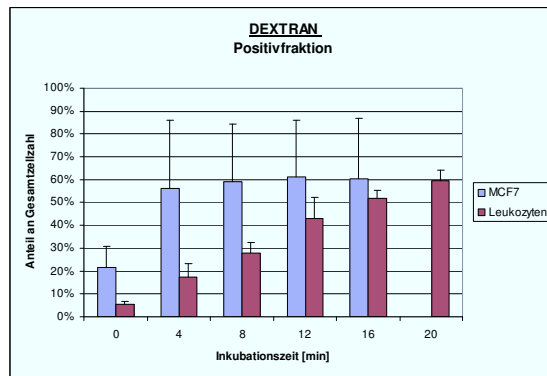


Abbildung 9: Vergleich der Interaktionskinetiken von Tumorzellen (MCF7) und Leukozyten mit verschiedenen umhüllten magnetischen Nanopartikeln, Diagramme zeigen die absolute Zahl an Zellen in der Positiv- und Negativfraktion ohne Bezug auf die Ausgangszellzahl in Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Einzelkinetiken, C Carboxy-, CM Carboxymethyl-

Tumorzellen (MCF7) zeigen eine schnelle Aufnahme der magnetischen Nanopartikel. Sofort nach ihrer Zugabe (0 min Separationswert) wird schon ein großer Anteil der Tumorzellen mit Partikeln beladen, so dass sich Werte zwischen 20 und 50 % Tumorzellen in der separierten Positivfraktion finden lassen. Nach 4-minütiger Inkubationszeit ist ein Gleichgewichtszustand erreicht, über 50 (bis 85) % der Tumorzellen befinden sich in der Positivfraktion. Auch nach Ablauf weiterer Inkubationszeit bleibt dieser Anteil stabil und es ist nur noch eine geringe Steigerung der Nanopartikelbeladung der Tumorzellen feststellbar.

Leukozyten hingegen zeigen eine langsamere, dafür aber kontinuierlich ansteigende Aufnahmekinetik. Sofort nach Partikelzugabe (0 min Separationswert) ist keine nennenswerte Aufnahme und/ oder Anlagerung zu verzeichnen. Nach 4-minütiger Inkubationszeit hat nur ein geringer Anteil der Leukozyten (10- maximal 25 %) Nanopartikel aufgenommen. Mit zunehmender Dauer der Inkubation steigt der Anteil der Leukozyten in der Positivfraktion stetig auf bis zu 30-65 % an. Große Mengen der Leukozyten verbleiben aber in der Negativfraktion und zeigen keine Nanopartikel-Aufnahme. Es lässt sich somit deutlich eine Lücke zwischen schneller, maximaler Partikelaufnahme in den Tumorzellen und langsamer, kontinuierlich ansteigender Partikelaufnahme der Leukozyten darstellen. Nach 4-minütiger Inkubation scheint dieses Unterscheidungsmerkmal am deutlichsten ausgeprägt zu sein, weil hier bereits die Mehrheit der Tumorzellen mit Nanopartikeln beladen sind, der Anteil der markierten Leukozyten aber gerade erst am Ansteigen ist. Man kann daraus schließen, dass besonders die Separation eines Tumorzell-Leukozytengemisches nach 4-minütiger Inkubationszeit eine hohe Trennschärfe verspricht. In der Klinik wäre diese Tatsache von hoher praktischer Relevanz, je größer diese Lücke ist, desto genauer wäre die Abtrennung von Tumorzellen aus Patientenblut möglich.

Im Vergleich der Partikel mit verschiedenen Zuckerderivatumhüllungen lässt sich feststellen, dass die beschriebene Charakteristik von Tumorzellen und Leukozyten beim Einsatz aller vier Nanopartikel zu erkennen ist. Eine erfolgreiche Separation ist somit mit allen vier Partikeln durchführbar. Es zeigen sich lediglich Unterschiede in der absoluten Höhe der Anteile der verschiedenen Zellarten in Positiv- und Negativfraktion. Dextran-umhüllte Nanopartikel erreichen den maximalsten Anteil von Leukozyten in der Positivfraktion (60-65 % nach 20-minütiger Inkubation) und somit auch den minimalsten Anteil von Leukozyten in der Negativfraktion, das heißt es

haben über 50 % der eingesetzten Leukozyten Nanopartikel mit Dextranhülle aufgenommen. Dieses Zuckerderivat als Hüllstruktur scheint bevorzugt von Leukozyten aufgenommen zu werden, was für die magnetische Zellseparation mit dem Ziel der Tumorzelldepletion aus peripherem Blut ungeeignet erscheint. Nanopartikel mit Carboxy-Dextran-, Carboxymethyl-Dextran- und Carboxymethyl-Cellulose- Hülle führten in einem geringeren Maße zur Beladung von Leukozyten. Hier finden sich maximal 30-50 % der Zellen in der Positivfraktion, dafür aber auch ein hoher Zellanteil in der Negativfraktion (65-85 %). Der höchste Anteil von Tumorzellen in der Positivfraktion ist bei Carboxymethyl-Dextran umhüllten Nanopartikeln zu verzeichnen (70-90 %). Hier sind nach 16-minütiger Inkubation nur noch 30 % der Tumorzellen in der Negativfraktion zu finden, das heißt es haben annähernd 70 % der eingesetzten Tumorzellen diese Partikel aufgenommen. Dieses Zuckerderivat als Hüllstruktur scheint somit am besten für die magnetische Zellseparation von MCF7 geeignet. Im Falle von Carboxymethyl-Cellulose schwankten die Werte der einzelnen Versuche besonders stark.

3.2. Inkubationsversuche an definierten Mischungen aus Tumorzellen und Leukozyten

Diese Versuche dienen der Überprüfung, ob die Ergebnisse der Separationen von reinen Zellpopulationen auch bei einem definierten Zellgemisch aus 95 % Leukozyten und 5 % Tumorzellen zu erzielen sind. Den Ansätzen aus $2,375 \times 10^6$ Leukozyten und $0,125 \times 10^6$ MCF7-Zellen wurden jeweils 2,5 µl an magnetischen Nanopartikeln mit den Umhüllungen Dextran, Carboxy-Dextran, Carboxymethyl-Dextran und Carboxymethyl-Cellulose zugefügt. Nach Erstellung der Kinetiken und Zellzählung erfolgte die Identifikation der Zielzellen mittels FACS aufgrund unterschiedlicher Zellgröße und Eigenfluoreszenz der Tumorzellen. Es wurde Blut gesunder Probanden mit Heparin- als auch EDTA-Zusatz zur Antikoagulation verwandt. Variierend wurde den Ansätzen humanes Blutplasma (2,5 %) zugegeben (Tab. 8).

Tabelle 8: Übersicht über die Versuchsansätze und die Anzahl der Durchführungen

Partikel	Heparinblut	EDTA- Blut	Heparinblut	EDTA- Blut
	ohne Plasma	ohne Plasma	+ 2,5 % Plasma	+ 2,5 % Plasma
Dextran	3 x	1 x	1 x	1 x
Carboxy-Dextran	3 x	1 x	1 x	1 x
Carboxymethyl-Dextran	3 x	1 x	1 x	1 x
Carboxymethyl-Cellulose	3 x	1 x	1 x	1 x

Im FACS wurden zunächst Leerproben beider Zellarten ohne Zugabe von Nanopartikeln gemessen. Durch Auftreten in unterschiedlichen Fluoreszenzbereichen konnten die Zellen deutlich unterschieden und Gates (M1, 2) gesetzt werden (Abb. 10). Die so detektierten prozentualen Anteile an MCF7 und Leukozyten wurden auf die Gesamtzahl aller Zellen in Positiv- und Negativfraktion bezogen und daraus die absolute Anzahl an Tumorzellen und Leukozyten in der Probe errechnet.

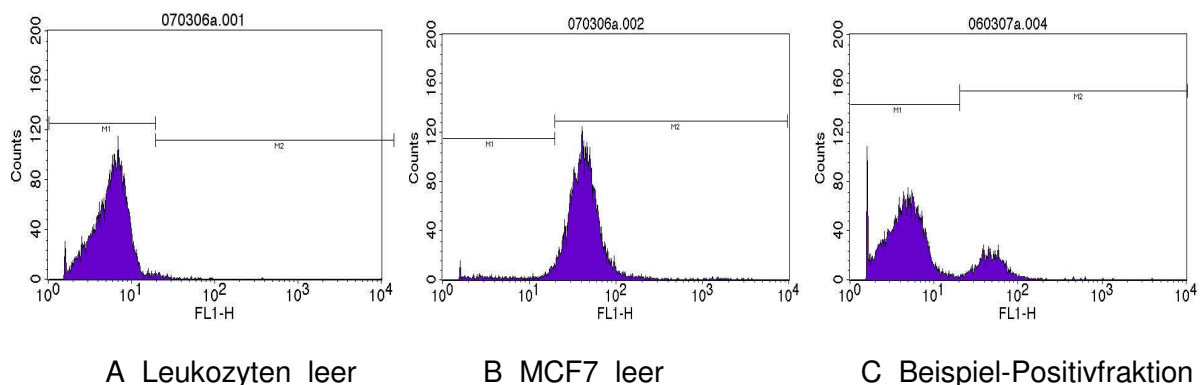


Abbildung 10: Histogramme der Leerproben (A, B) veranschaulichen das Auftreten der Zellen in unterschiedlichen Fluoreszenzbereichen; daneben das Beispiel einer Positivfraktion (C) mit abgereicherten Leukozyten und angereicherten Tumorzellen (MCF7)

Allgemein ließ sich feststellen, dass die Beladung von MCF7 mit magnetischen Nanopartikeln in den Inkubationsversuchen stark schwankte. Hingegen ist die Partikelbeladung der Leukozyten vergleichbar zwischen den verschiedenen umhüllten Partikeln. Durch Inkubation und Magnetseparation entstanden hohe Zellverluste (30-50 % der eingesetzten Zellen). Unter Verwendung von Blutproben mit EDTA-Zusatz sind im Vergleich zu Heparinblut geringere Partikelaufruhmeraten und höhere Zellverluste zu verzeichnen. Der Zusatz von 2,5 % humanem Plasma führte zur Reduktion der abgereicherten Tumorzellen in der Positivfraktion. Vergleichend sind

folgend die partikelbezogenen Graphiken der 3 Einzelkinetiken unter Verwendung von Heparinblut dargestellt (Abb. 11- 14). Auf Besonderheiten hinsichtlich Plasma- und EDTA-Zusatz wird eingegangen.

3.2.1. Tumorzellanreicherung der verschiedenen Nanopartikel

Dextran

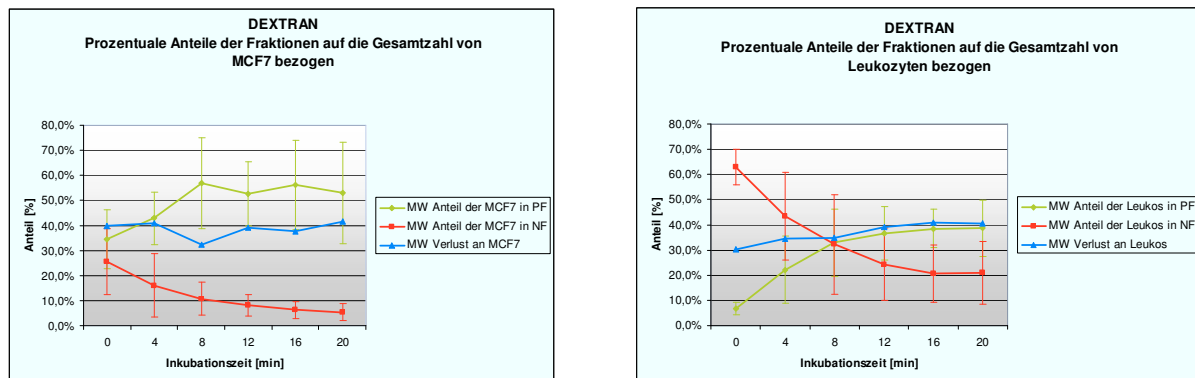


Abbildung 11: Dextran-Partikel, Graphiken zeigen die Ergebnisse aus 3 Einzelkinetiken Heparinblut mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung, kein Plasmazusatz, PF Positivfraktion, NF Negativfraktion

MCF7 zeigen eine gute Aufnahme der Dextran-umhüllten Nanopartikel (bis 50 %) und stellen somit nur geringe Anteile der Negativfraktion. Der Tumorzellverlust in den Separationen beträgt bis zu 50 % und steigt bei Verwendung von EDTA-Blut auf 80 % an. Leukozyten zeichnen sich durch eine relativ konstante Nanopartikel-Aufnahme (30-40 %) in den verschiedenen Versuchsansätzen aus. Es ist eine Kinetik darstellbar mit einem langsamen Anstieg in den ersten 12 min der Inkubationszeit. Die Verwendung von EDTA bleibt ohne Einfluss auf die Leukozyten. Vorteilhaft ist die hohe Aufnahmerate Dextran-umhüllter Partikel in Tumorzellen bereits ab Inkubationsbeginn (40 % nach 0 min) sowie die langsam mit der Inkubationszeit ansteigende Aufnahme in Leukozyten. Dies ermöglicht eine Zellseparation bis zu einer Inkubationszeit von 10-12 min. Beim Einsatz von Dextran-umhüllten Nanopartikeln gelang eine Tumorzellanreicherung in der Positivfraktion von maximal 21 %. Bei eingesetzten 5 % MCF7 bedeutet dies eine Anreicherung um das 4-fache. Der Leukozytenanteil in der Negativfraktion betrug zu allen Inkubationszeiten über 96 %. Tabelle 9 veranschaulicht zum Abschluss des Versuches die Tumorzellanreicherung im Zeitverlauf der Inkubation im Vergleich aller Nanopartikel.

Carboxy- Dextran

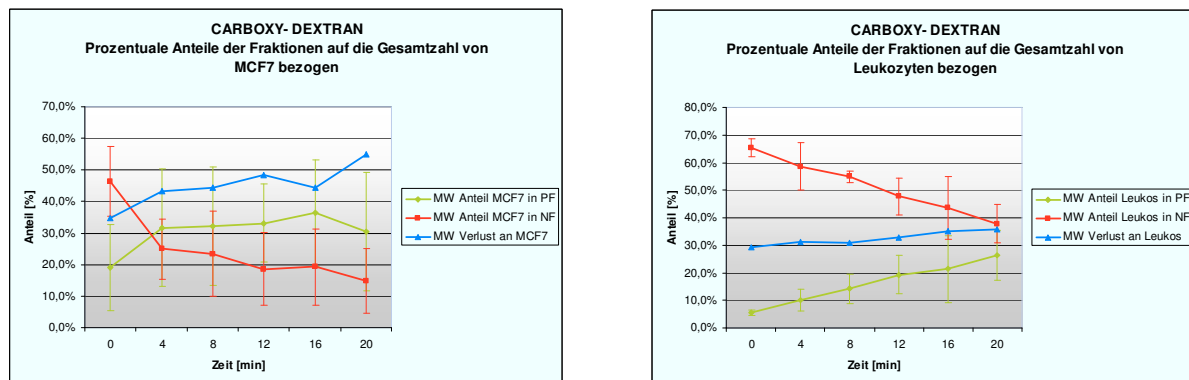


Abbildung 12: Carboxy-Dextran-Partikel, Graphiken zeigen die Ergebnisse aus 3 Einzelkinetiken Heparinblut mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung, kein Plasmazusatz, PF Positivfraktion, NF Negativfraktion

Unter Verwendung von Carboxy-Dextran-umhüllten Nanopartikeln schwanken die Anteile von Tumorzellen in der Positivfraktion zwischen 25 und 40 %. Die Tumorzellverluste sind mit 50-80 % hoch. EDTA-Zusatz lässt keinen Einfluss erkennen. Leukozyten hingegen zeigen geringere Aufnahmeraten (20 %). Die Zellverluste an Leukozyten betragen 30-40 %. In den ersten 5 min der Inkubationszeit ist im Vergleich zu Dextran eine geringere Nanopartikel-Aufnahme in die Tumorzellen zu verzeichnen, Maximalwerte werden erst nach 5 min Inkubationszeit erreicht. Leukozyten zeigen wie beim Einsatz von Dextran langsam ansteigende Aufnahmeraten, erreichen aber geringere Maximalwerte. Eine Zellseparation ist besonders zu Beginn der Inkubation (0-10 min) problematisch, weil hier die Partikel Aufnahme in Tumorzellen und Leukozyten annähert gleichstark verläuft und keine zellspezifischen Unterschiede deutlich werden. Beim Einsatz von Carboxy-Dextran-umhüllten Nanopartikeln gelang eine Tumorzellanreicherung in der Positivfraktion von maximal 14 %. Bei eingesetzten 5 % MCF7 bedeutet dies eine Anreicherung um das nahezu 3-fache. Der Leukozytenanteil in der Negativfraktion betrug auch hier zu allen Inkubationszeiten über 96 %. Eine Zusammenfassung ist in Tabelle 9 am Ende des Versuchs dargestellt.

Carboxymethyl- Dextran

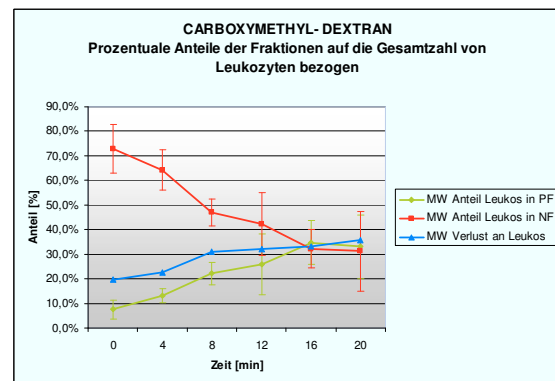
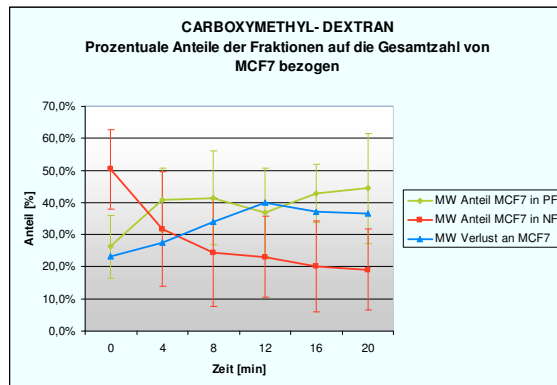


Abbildung 13: Carboxymethyl-Dextran-Partikel, Graphiken zeigen die Ergebnisse aus 3 Einzelkinetiken Heparinblut mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung, kein Plasmazusatz, PF Positivfraktion, NF Negativfraktion

Bei der Verwendung von Carboxymethyl-Dextran-umhüllten Nanopartikeln sind die MCF7-Zellen durch eine schwankende Beladung zwischen 20-60 % gekennzeichnet. Unter Zugabe von EDTA wird dieser Anteil deutlich reduziert, weiterhin kommt es zum Anstieg des Zellverlustes. Leukozyten zeigen hier im Vergleich aller vier Nanopartikel die geringste Aufnahme (10-maximal 20 %). Zellverluste an Leukozyten steigen mit Dauer der Inkubationszeit stetig an. In Tumorzellen erfolgt die Nanopartikel-Aufnahme zum Großteil zwischen 0-4 Minuten der Inkubationszeit (bis 40 %). Im Vergleich zu allen anderen Nanopartikeln sind Maximalwerte von 60 % Partikelaufnahme in MCF7 erreichbar. Verglichen mit allen Separationskinetiken der verschiedenen Partikel zeichnen sich Leukozyten hingegen durch die geringsten Aufnahmemengen (maximal 10 %) in den ersten 5 Minuten der Inkubationszeit aus. Danach steigt die Nanopartikel-Aufnahme in Leukozyten nur noch leicht an. Dies ergibt die günstigsten Voraussetzungen zur Auftrennung eines Tumorzell-Leukozytengemisches und unterstreicht die Favorisierung von Carboxymethyl-Dextran-umhüllten Nanopartikeln. Beim Einsatz dieser Partikel gelang eine Tumorzellanreicherung in der Positivfraktion von maximal 20 %. Bei eingesetzten 5 % MCF7 bedeutet dies eine Anreicherung um das 4-fache. Der Leukozytenanteil in der Negativfraktion betrug zu allen Inkubationszeiten über 95 %. Zusammenfassend wird wieder auf Tabelle 9 verwiesen.

Carboxymethyl- Cellulose

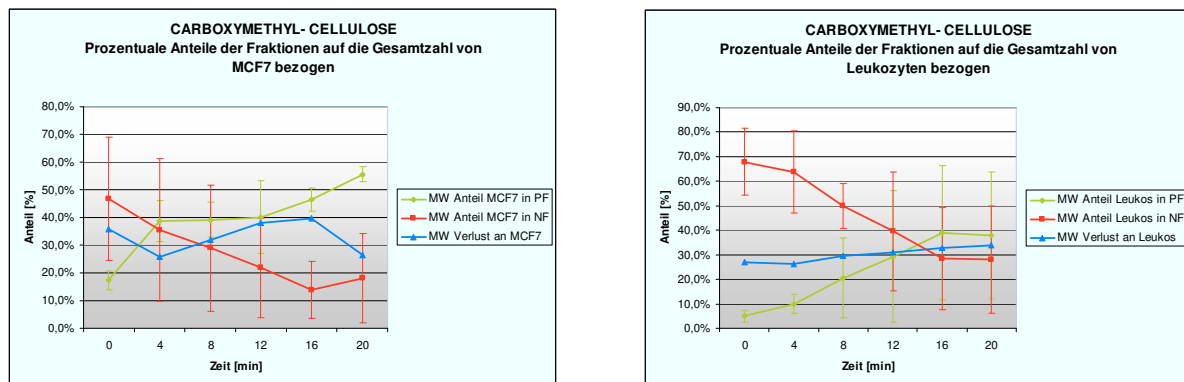


Abbildung 14: Carboxymethyl-Cellulose-Partikel, Graphiken zeigen die Ergebnisse aus 3 Einzelkinetiken Heparinblut mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung, kein Plasmazusatz, PF Positivfraktion, NF Negativfraktion

MCF7-Zellen nehmen Carboxymethyl-Cellulose-umhüllte Partikel bis zu 50 % auf. Auch hier sind unter EDTA-Verwendung reduzierte Aufnahmezeiten zu verzeichnen. Die Tumorzellverluste sind schwankend, unter EDTA-Einsatz wiederum erhöht. Leukozyten zeigen Aufnahmezeiten bis maximal 20 %. Der Zellverlust beträgt 30-40 %. Diese Nanopartikel zeigen ebenfalls günstige Kinetiken zur Zellseparation. Es erfolgt in den ersten 10 Minuten der Inkubationszeit eine rasche Aufnahme der Partikel in die Tumorzellen. Leukozyten zeigen eine verzögerte aber langsam kontinuierlich ansteigende Partikelaufnahme mit Maximalwerten nach 15- bis 20-minütiger Inkubation. Beim Einsatz von Carboxymethyl-Cellulose-umhüllten Nanopartikeln gelang eine Tumorzellanreicherung in der Positivfraktion von maximal 19 %. Bei eingesetzten 5 % MCF7 bedeutet dies eine Anreicherung um das nahezu 4-fache. Der Leukozytenanteil in der Negativfraktion betrug zu allen Inkubationszeiten über 95 %. Tabelle 9 veranschaulicht die Tumorzellanreicherung im Zeitverlauf der Inkubation im Vergleich aller Nanopartikel.

Tabelle 9: maximal mögliche Tumorzellanreicherung (%) in der Positivfraktion in Abhängigkeit von der Inkubationszeit im Partikelvergleich; (entspr.) bedeutet den daraus berechneten Anreicherungsfaktor bei eingesetzten 5 % Tumorzellen

Zeit [min]	Dextran		Carboxy-Dextran		Carboxy-Methyl-Dextran		Carboxy-Methyl-Cellulose	
	[%]	entspr.	[%]	entspr.	[%]	entspr.	[%]	entspr.
0	21,34	4,3	14,35	2,9	20,15	4,0	19,14	3,8
4	10,71	2,1	14,00	2,8	15,26	3,1	16,08	3,2
8	8,58	1,7	10,12	2,0	10,21	2,0	8,52	1,7
12	7,41	1,5	8,91	1,8	7,55	1,5	7,18	1,4
16	7,03	1,4	8,71	1,7	7,19	1,4	6,67	1,3
20	6,63	1,3	6,13	1,2	7,34	1,5	6,46	1,3

3.2.2. Einfluss von humanem Plasma auf die Tumorzellanreicherung

In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von humanem Plasma zu den Versuchsansätzen Einfluss auf das Ergebnis der magnetischen Separation nimmt. Humanes Plasma wurde als regulierender Faktor, der zur reduzierten Partikelaufnahme insbesondere in Leukozyten führt, identifiziert. Es wurden jeweils 2 Versuche pro Nanopartikel durchgeführt und die Ergebnisse der Tumorzell- und Leukozytenanreicherung in der Positivfraktion gegenübergestellt.

Dextran

Unter Zumischung von Plasma ist eine reduzierte Beladung (30 % vs. > 50 % ohne Plasma) der Tumorzellen zu verzeichnen. Deutlich geringere Aufnahmeraten (15 % vs. 30-40 % ohne Plasma) ergeben sich in Leukozyten nach Plasmazusatz (Abb. 15). Es gelang eine Tumorzellanreicherung in der Positivfraktion von maximal 16 %. Bei eingesetzten 5 % MCF7 bedeutet dies eine Anreicherung um das 3-fache. Der Leukozytenanteil in der Negativfraktion betrug zu allen Inkubationszeiten über 95 %.

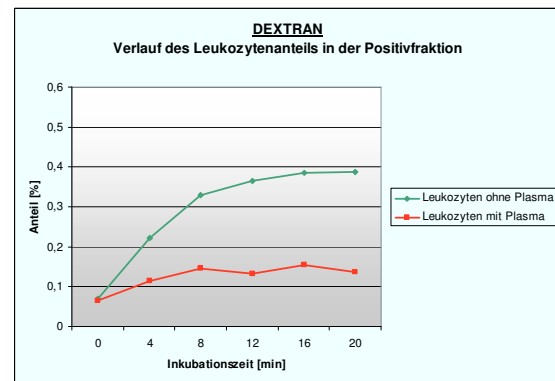
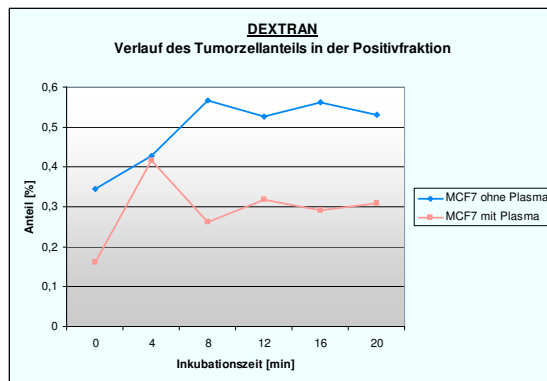


Abbildung 15: zeigt Mittelwerte der Tumorzellanteile (links) und Leukozytenanteile (rechts) der Positivfraktion im Zeitverlauf aus 2 Einzelversuchen mit Plasmazusatz, Zahlenwerte sind dabei bezogen auf die Gesamtzahl der eingesetzten Tumorzellen bzw. Leukozyten

Carboxy-Dextran

Die Tumorzellverluste sind mit 50-80 % hoch, reduzieren sich aber unter Plasmazusatz. In der Partikelbeladung der Tumorzellen sind durch Plasmazugabe kaum Veränderungen feststellbar. Leukozyten hingegen zeigen allgemein geringere Aufnahmeraten (20 %), die sich nach Plasmazusatz zusätzlich auf 15 % reduzieren (Abb. 16). Es gelang eine Tumorzellanreicherung in der Positivfraktion von maximal 13 %. Bei eingesetzten 5 % MCF7 bedeutet dies eine Anreicherung um das 2,6-fache. Der Leukozytenanteil in der Negativfraktion betrug zu allen Inkubationszeiten über 95 %.

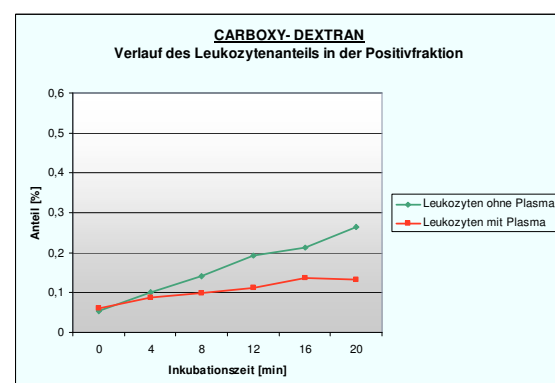
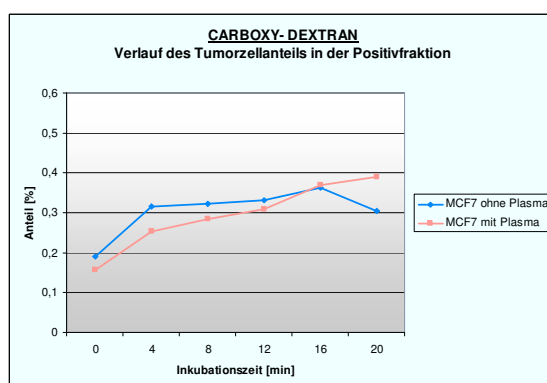


Abbildung 16: zeigt Mittelwerte der Tumorzellanteile (links) und Leukozytenanteile (rechts) der Positivfraktion im Zeitverlauf aus 2 Einzelversuchen mit Plasmazusatz, Zahlenwerte sind dabei bezogen auf die Gesamtzahl der eingesetzten Tumorzellen bzw. Leukozyten

Carboxymethyl-Dextran

Unter Plasmazumischung sind MCF7-Zellen durch eine schwankende Beladung zwischen 20-35 % gekennzeichnet. Leukozyten zeigen Aufnahmezeiten bis 35 %, die sich jedoch durch Plasmazusatz auf 10-15 % reduzieren (Abb. 17). Es gelang eine Tumorzellanreicherung in der Positivfraktion von maximal 14 %. Bei eingesetzten 5 % MCF7 bedeutet dies eine Anreicherung um das nahezu 3-fache. Der Leukozytenanteil in der Negativfraktion betrug zu allen Inkubationszeiten über 95 %.

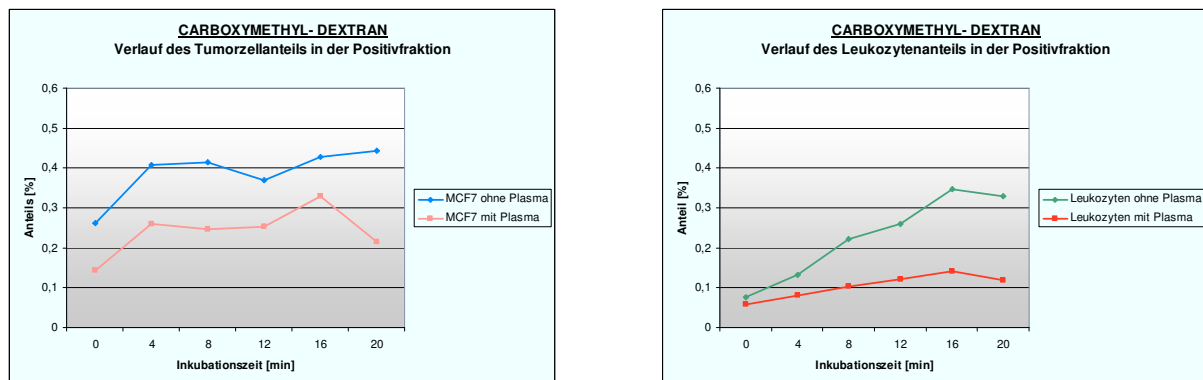


Abbildung 17: zeigt Mittelwerte der Tumorzellanteile (links) und Leukozytenanteile (rechts) der Positivfraktion im Zeitverlauf aus 2 Einzelversuchen mit Plasmazusatz, Zahlenwerte sind dabei bezogen auf die Gesamtzahl der eingesetzten Tumorzellen bzw. Leukozyten

Carboxymethyl-Cellulose

Auch hier ist unter Plasmazusatz eine reduzierte Beladung der Tumorzellen (25-30 % vs. >40 % ohne Plasma) feststellbar. Leukozyten zeigen Aufnahmezeiten bis maximal 38 %, die sich unter Plasmazusatz auf 15 % reduzieren (Abb. 18). Es gelang eine Tumorzellanreicherung in der Positivfraktion von maximal 12 %. Bei eingesetzten 5 % MCF7 bedeutet dies eine Anreicherung um das 2,5-fache. Der Leukozytenanteil in der Negativfraktion betrug zu allen Inkubationszeiten über 95 %.

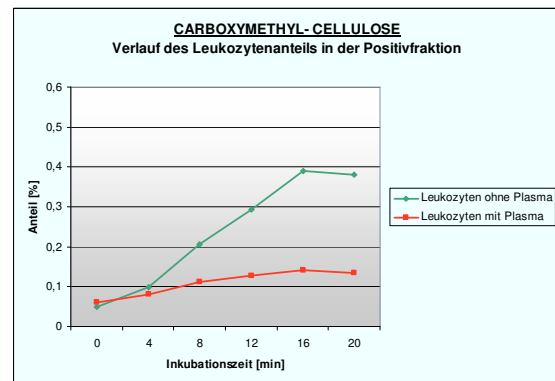
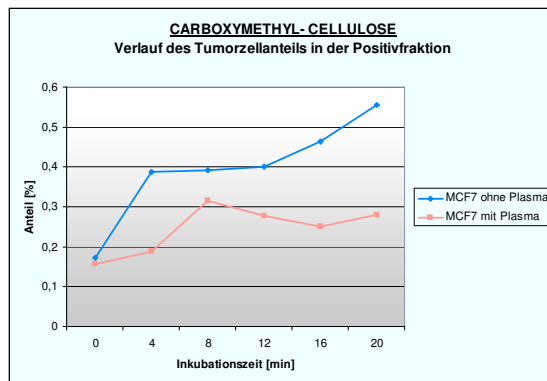


Abbildung 18: zeigt Mittelwerte der Tumorzellanteile (links) und Leukozytenanteile (rechts) der Positivfraktion im Zeitverlauf aus 2 Einzelversuchen mit Plasmazusatz, Zahlenwerte sind dabei bezogen auf die Gesamtzahl der eingesetzten Tumorzellen bzw. Leukozyten

Zusammenfassend kommt es durch die Zugabe von 2,5 % humanem Plasma zu den Versuchsansätzen zur reduzierten Nanopartikelbeladung in Tumorzellen (MCF7) und Leukozyten. Die Anreicherung von MCF7 in der Positivfraktion ist im Durchschnitt um 10-15 % reduziert - mit Ausnahme des Einsatzes von Carboxy-Dextran-Nanopartikeln, hier ergab die Plasmazugabe kaum Veränderungen. In Tabelle 10 sind die maximal möglichen Tumorzellanreicherungen in den Positivfraktionen ohne und mit Plasmazusatz im Partikelvergleich gegenübergestellt. Vom Plasmazusatz weitaus stärker beeinflusst zeigten sich Leukozyten, deren Anteil in der Positivfraktion von durchschnittlich 30 % auf unter 15 % absank. Dieses Verhalten stellt hypothetisch einen Separationsvorteil dar, da geringe Leukozytenanteile in der Positivfraktion gewünscht sind.

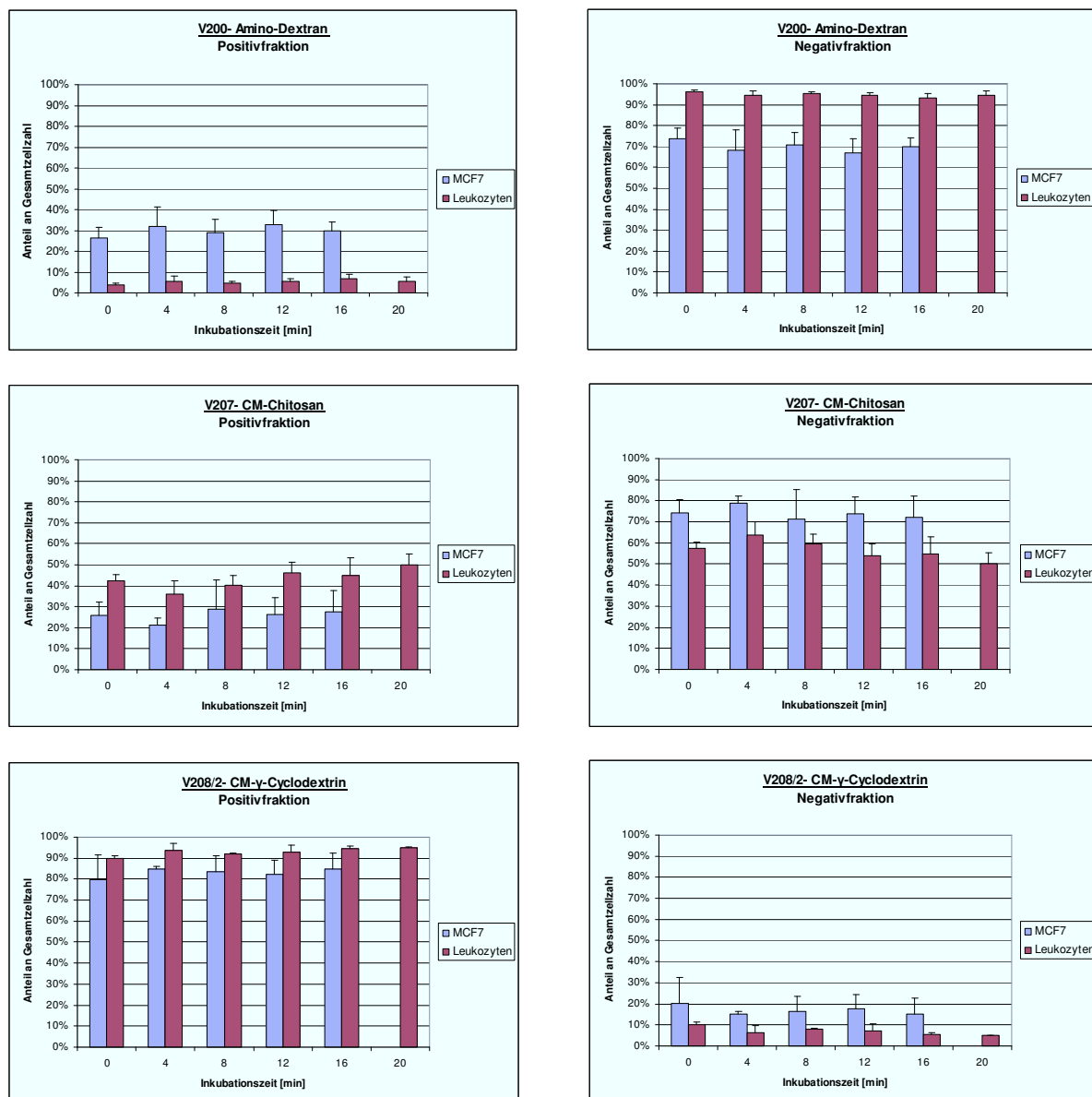
Tabelle 10: maximal mögliche Tumorzellanreicherung (%) in der Positivfraktion ohne und mit Zusatz von 2,5 % humanem Blutplasma im Partikelvergleich

Nanopartikelhülle	Tumorzellanreicherung ohne Plasmazusatz	Tumorzellanreicherung mit Plasmazusatz
Dextran	21 %	16 %
Carboxy-Dextran	14 %	13 %
Carboxymethyl-Dextran	20 %	14 %
Carboxymethyl-Cellulose	19 %	12 %

3.3. Testung magnetischer Nanopartikel der Fa. Innovent e. V., Jena

3.3.1. Interaktionskinetiken mit reinen Tumorzell- und Leukozytenkulturen

Analog zu den Versuchen mit eigenumhüllten Partikeln wurden diese Nanopartikel mit den Hüllen Amino-Dextran, Carboxymethyl-Chitosan, Carboxymethyl- γ -Cyclodextrin sowie Carboxymethyl- β -Cyclodextrin getrennt an Tumorzellen (MCF7) und Leukozyten untersucht. Es erfolgte die magnetische Zellseparation und Erstellung der Kinetiken nach 4, 8, 12, 16 (bei Leukozyten zusätzlich 20) Minuten Inkubationszeit. Nach Zellzählung wurde der prozentuale Anteil der verschiedenen Zellen an Positiv- und Negativfraktion berechnet und folgend partikelbezogen graphisch dargestellt (Abb. 19).



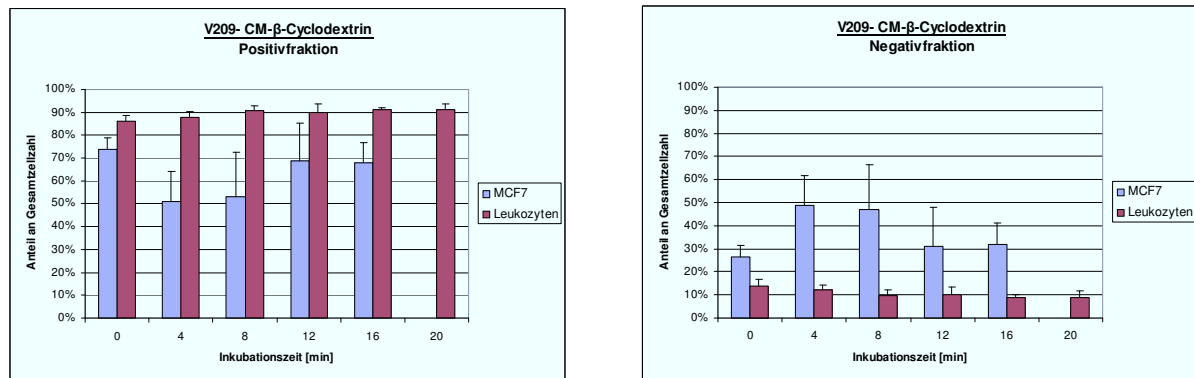


Abbildung 19: Vergleich der Interaktionskinetiken von Tumorzellen (MCF7) und Leukozyten mit verschiedenen umhüllten magnetischen Nanopartikeln, Diagramme zeigen die absolute Zahl an Zellen in der Positiv- und Negativfraktion ohne Bezug auf die Ausgangszellzahl in Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Einzelkinetiken, CM Carboxymethyl-

Bei keinem der vier getesteten Nanopartikel lässt sich eine eindeutige Kinetik - weder bei Tumorzellen noch bei Leukozyten - darstellen. Lediglich bei V 207 ist ein minimal steigender Anteil an Leukozyten in der Positivfraktion zu erahnen. Weiterhin sind deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Nanopartikeln zu verzeichnen: V 200 Amino-Dextran zeigt nur geringe Markierungsraten bei Tumorzellen (25-35 % in der Positivfraktion), von Leukozyten werden diese Partikel zu einem noch geringerem Prozentsatz aufgenommen (unter 10 %). Es besteht keine Zeitabhängigkeit der Nanopartikel-Aufnahme, ab Inkubationsbeginn (0 min) sind annähernd gleiche Werte erreicht. V 207 Carboxymethyl-Chitosan zeigt eine 20-40 %ige Markierung von Tumorzellen ohne Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Der Anteil der Leukozyten in der Positivfraktion steigt von 35 auf 50 % langsam kontinuierlich im Zeitverlauf an. V 208/2 Carboxymethyl-γ-Cyclodextrin wurde von Tumorzellen und Leukozyten in nahezu gleichem Maße stark aufgenommen (MCF7 > 80 %, Leukozyten > 90 %). Es ist keine Zeitabhängigkeit zu verzeichnen. V 209 Carboxymethyl-β-Cyclodextrin zeigt eine starke, konstante Markierung der Leukozyten (> 85 %) ab Beginn der Inkubation (0 min). Tumorzellen nehmen diese Partikel zu 50-80 % auf mit leichtem Anstieg im Zeitverlauf.

Keiner dieser Nanopartikel lässt sich mit den optimalen Trennungseigenschaften von Carboxymethyl-Dextran-umhüllten Partikeln vergleichen.

3.4. Langzeiteffekte magnetischer Nanopartikel auf Tumorzellen

Mit Hilfe dieser Versuchsreihe sollten die Auswirkungen magnetischer Nanopartikel auf die Vitalität von Tumorzellen (MCF7) erörtert werden. Dazu wurden MCF7-Kulturen mit jeweils 20 µl Eisenoxid-Partikeln inkubiert. Es kamen Magnetpartikel mit folgenden Umhüllungen zum Einsatz: Carboxymethyl-Dextran, Amino-Dextran, Carboxymethyl-Chitosan, Carboxymethyl-γ-Cyclodextrin und Carboxymethyl-β-Cyclodextrin. Nach 1, 2, 4 und 7 Tagen wurden die Zellkulturen geerntet, mittels MACS separiert, die einzelnen Fraktionen am Coulter® Z2 gezählt und anschließend die Positivfraktion wieder neu ausgesät. Jeweils vor der Magnetseparation wurde ein Aliquot entnommen und in den Apoptose-Test eingesetzt (2.6.1.). Durch FACS konnte so der prozentuale Anteil an nekrotischen und apoptotischen Tumorzellen bestimmt werden. Zusätzlich wurden allen Proben vor der Wiederaussaat 1 % Penicillin/Streptomycin zugefügt, um das Infektionsrisiko zu verringern. Der Gesamtversuch wurde 2-mal durchgeführt und hier mit Inkubation A und B bezeichnet. Zu Versuchsbeginn wurde eine MCF7 Leerprobe mitgeführt, um das Aussehen und Wachstumsmuster der Zellen beobachten und vergleichen zu können. Am zweiten Inkubationstag erfolgte die Durchführung des Apoptosetests (Abb.20).

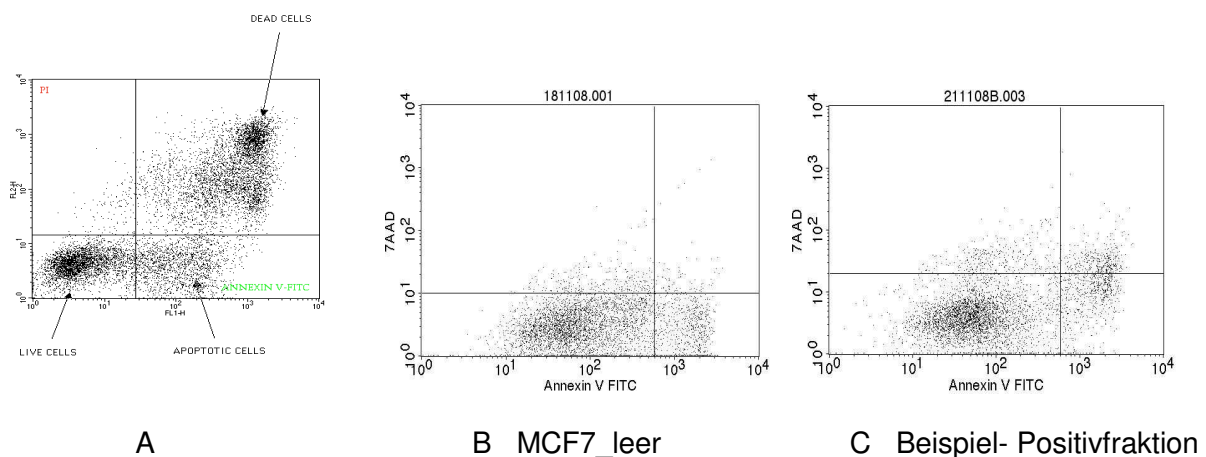


Abbildung 20: (A) erklärende Darstellung einer Zellpopulation im Apoptosetest als Dot Plot aus www.facsclab.unibe.ch/apop.html; (B) MCF7 ohne Nanopartikelzugabe am 2. Inkubationstag; (C) Beispiel einer Positivfraktion am 2. Inkubationstag mit Anstieg der nekrotischen Zellen im oberen rechten Quadranten;

Anmerkung: die Setzung des Zielgitters ist nicht vergleichbar, da in (A) andere Kulturzellen verwandt wurden

Beide Inkubationsversuche wurden in gleicher Art und Weise parallel aber zeitversetzt durchgeführt. Erhaltene Ergebnisse werden graphisch verglichen aber gemeinsam dargestellt. Im Unterschied zur ersten Versuchsdurchführung ist in Inkubation B eine Kultivierung bis Tag 7 teilweise gelungen. Eine Kontrollprobe ohne Nanopartikelzusatz konnte leider nur an Tag 1 und 2 mitgeführt werden. Sie ergab eine Apoptoserate von 26 % der nativen Kulturzellen. In Abbildung 21 sind die Ergebnisse aus beiden Versuchsdurchführung (Inkubation A und B) gegenübergestellt:

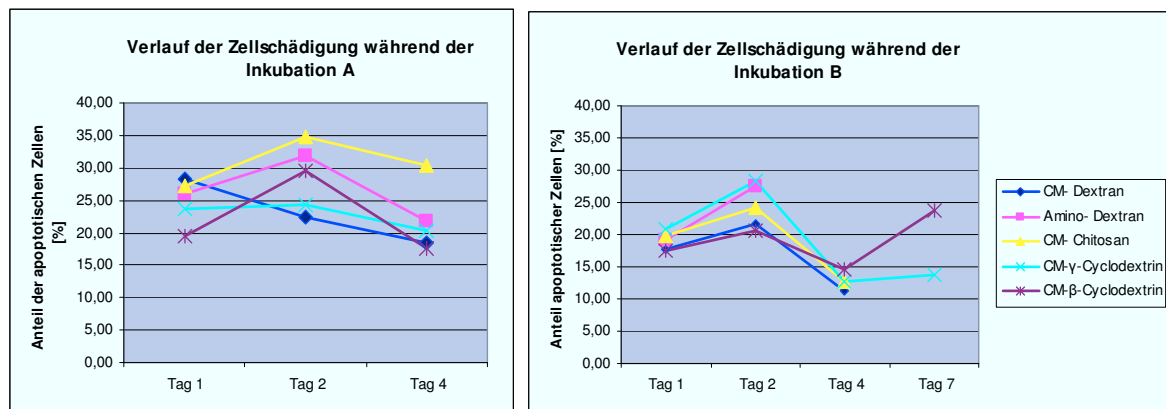


Abbildung 21: Anteile der apoptotischen und nekrotischen Tumorzellen (MCF7) im Verlauf der Langzeitinkubation A und B, CM Carboxymethyl-

Im Falle von Carboxymethyl-Dextran-Partikeln waren am ersten Tag 17 bzw. 28 % der Zellen apoptotisch. Dies ist mit dem Kontrollwert (Leerprobe ohne Nanopartikelzusatz) vergleichbar und stellt ein normales Charakteristikum der Tumorzelllinie MCF7 dar begründbar durch den hohen Zellumsatz. An Tag 2 waren eine Abnahme der Anzahl an gesunden Zellen sowie eine Zunahme von apoptotischen und nekrotischen Zellen zu verzeichnen. Tag 4 zeichnete sich durch eine deutliche Abnahme der Apoptose (11 bzw. 18 %) und Nekrose aus. Diese Tendenz der Restitution der Tumorzellen wurde in beiden Inkubationen beobachtet.

Beim Einsatz von V 200 Amino-Dextran-umhüllten Partikeln waren am ersten Tag 18 bzw. 26 % der Tumorzellen apoptotisch, dies entspricht dem gleichen Niveau wie bei Carboxymethyl-Dextran. Am zweiten Tag erfolgte dann eine starke Zunahme der Apoptose auf 27 bzw. 31 %, möglicherweise setzte die beeinflussende Wirkung der Partikel auf Zellen etwas später ein. An Tag 4 war in Inkubation A eine Verschiebung der Gesamtpopulation der Zellen in Richtung Nekrose zu verzeichnen, die

Apoptoserate reduzierte sich nur leicht. In Inkubation B war eine Separation aufgrund zu geringer Zellzahl nicht möglich und der Inkubationsversuch dieses Partikels damit vorzeitig beendet.

Unter Verwendung von V 207 Carboxymethyl-Chitosan-Partikeln betrug die Apoptoserate an Tag 1 der Inkubation 19 bzw. 28 %. In der FACS-Auswertung ließ sich ein auffällig anderes Verteilungsmuster der gesunden Zellen darstellen. Am zweiten Tag war die Zunahme des Zelltodes zu verzeichnen, große Anteile der Zellpopulation gingen unter. In der neuen Zellaussaat von Tag 4 sank die Apoptoserate, der Anteil gesunder Zellen stieg wieder auf das Niveau von Tag 1 an. Wiederholt war in beiden Versuchsdurchführungen festzustellen, dass die Zellwolke gesunder Zellen etwas in Richtung Nekrose verschoben blieb.

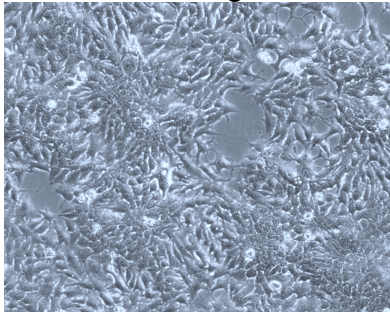
Im Versuchsansatz mit V 208/2 Carboxymethyl- γ -Cyclodextrin-Partikeln zeigten die Tumorzellen an Tag 1 eine Apoptoserate von 20 bzw. 23 %. Am zweiten Inkubationstag waren eine deutliche Zunahme des Zelltodes sowie die Verschiebung der Gesamtpopulation in Richtung Nekrose zu verzeichnen. Tag 4 war geprägt von rückläufiger Apoptose und Nekrose, die Anzahl der gesunden Zellen stieg. Erstmals war in Inkubation B die Beobachtung an Tag 7 möglich. Die Tumorzellpopulation hatte wieder ihr Ausgangsniveau erreicht, wirkte sehr kompakt ohne große Streuung in der FACS-Darstellung mit nur einem sehr geringen Anteil an apoptotischen Zellen (13 %).

Im Falle von V 209 Carboxymethyl- β -Cyclodextrin-Partikeln lag am ersten Inkubationstag der geringste „Anfangsschaden“ im Vergleich aller Nanopartikel vor (17 bzw. 19 %). An Tag 2 stieg die Apoptoserate auf 21 bzw. 29 % an, gleichzeitig war auch die Zunahme an nekrotischen Zellen zu verzeichnen. Zellschädigungen wirkten sich somit möglicherweise erst am 2. Tag aus. Am 4. Inkubationstag waren trotz sinkender Apoptoserate (15 bzw. 17 %) noch viele nekrotische Zellen zu beobachten. Eine Weiterkultivierung gelang nur in Inkubation B. Hier konnte an Tag 7 eine deutliche Population toter Tumorzellen abgegrenzt werden. Es kam zum Wiederanstieg der Apoptoserate auf 24 %.

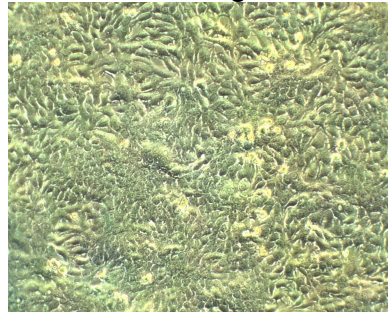
Nachfolgend sind die mikroskopischen Bilder der MCF7-Kulturen (40-fache Vergrößerung) an den einzelnen Inkubationstagen dargestellt:

Kontrolle - MCF7 ohne Partikel

1. Tag



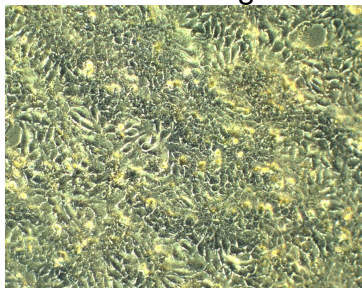
2. Tag



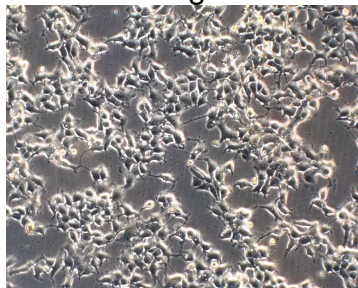
Die Kulturzellen wachsen adhären am Flaschenboden des Kulturgefäßes und bilden einen von Tag zu Tag dichter werdenden Zellrasen aus. Es bestehen Zell-Zellverbindungen sowie die Ausbildung von Pseudopodien. Das Kulturmedium erscheint durchsichtig klar. Demgegenüber sind Unterschiede nach Partikelzugabe zu beobachten. In den folgenden Abbildungen sind die Kulturzellen in ihrer Anzahl dezimiert, sie wirken abgekugelt rund in ihrer Morphologie. Interzellkontakte und Pseudopodien sind reduziert. Ein getrübtetes Kulturmedium deutet auf Verunreinigung oder bakterielle Kontamination hin. Aggregate von Nanopartikeln kommen zur Darstellung.

Carboxymethyl-Dextran

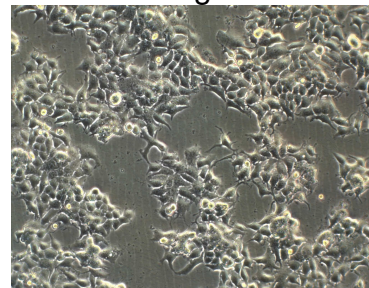
1. Tag



2. Tag

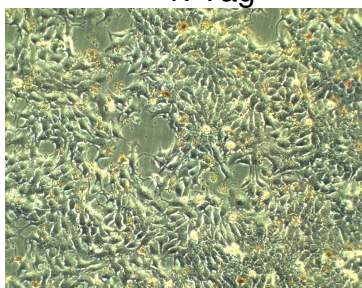


4. Tag

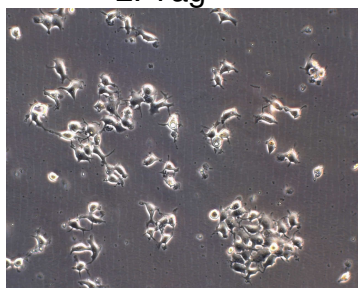


V 200 Amino-Dextran

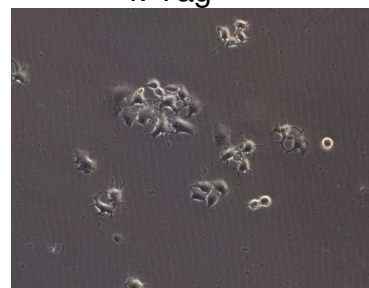
1. Tag



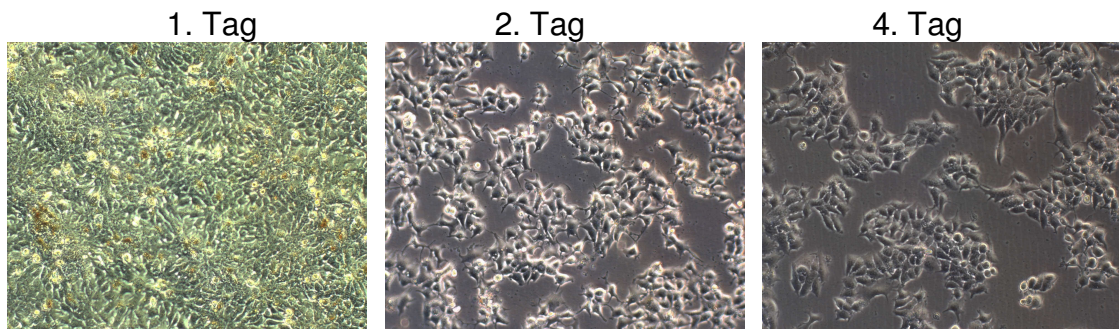
2. Tag



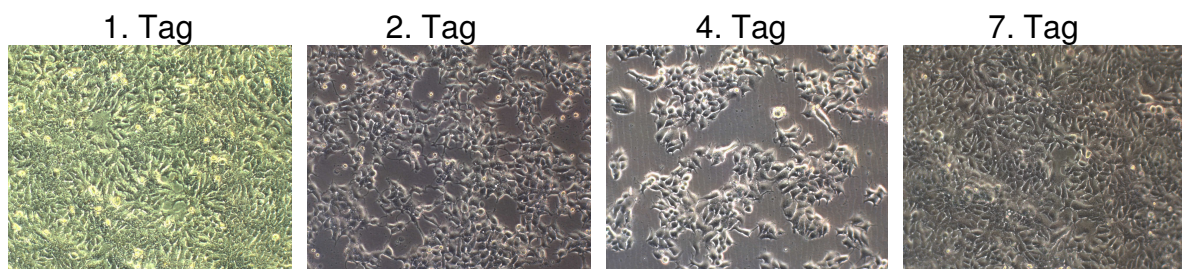
4. Tag



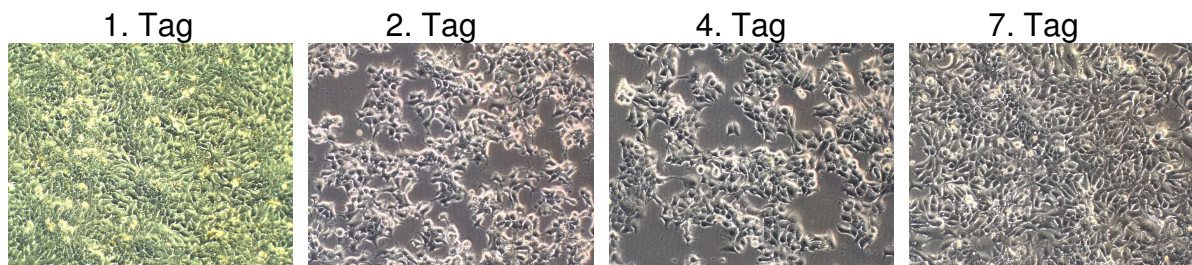
V 207 Carboxymethyl-Chitosan



V 208/2 Carboxymethyl- γ -Cyclodextrin



V 209 Carboxymethyl- β -Cyclodextrin



Zusammenfassend für die Langzeitinkubationen ist festzuhalten, dass sich die Tumorzellen am 1. Inkubationstag kaum verändert zeigen gegenüber einer mitgeführten Leerprobe ohne Zusatz von Nanopartikeln. Wie in der Kontrollprobe sind große Anteile der Zellpopulation in Richtung Apoptose und Nekrose verschoben, dies entspricht einem typischen Charakteristikum einer Tumorzelllinie mit hohem Zellumsatz. Am 2. Inkubationstag zeigen MCF7 im Vergleich der verschiedenen Partikel unterschiedlich hohe Anteile an geschädigten Zellen, was unterschiedliche Schädigungsmechanismen oder Adaptationsstrategien vermuten lässt. Am Tag 4 bestehen weitestgehend Anzeichen für eine Erholung der Zellen. Teilweise ist eine Wiederherstellung des Ausgangsniveaus möglich, teilweise bleibt die Population

dauerhaft in Richtung Nekrose verschoben. In Inkubation A konnten am 7. Tag keine Separationen durchgeführt werden, da alle Zellkulturen trotz der Zugabe von Antibiotika (1 % Penicillin/Streptomycin) infiziert waren. Dies ist damit zu begründen, dass viele Arbeitsschritte (MACS, FACS) nicht unter sterilen Bedingungen durchführbar sind und die damit untersuchten Positivfraktionen wieder zur Aussaat gebracht wurden. V 200-Partikel wurden am geringsten durch die Tumorzellen aufgenommen. Am Tag 4 der Inkubation B reichten die Zellen nicht zur Durchführung des Apoptosetests aus und der Inkubationsversuch musste vorzeitig beendet werden. Ab dem 4. Inkubationstag erfolgte in Inkubation B die zusätzliche Zugabe von 1 % Antibiotic/Antimycotic zum Kulturmedium um die Infektionsgefahr herabzusetzen. Nichtsdestotrotz waren am Tag 7 nur zwei Kulturflaschen nicht infiziert und damit auswertbar. Im Gegensatz zur ersten Versuchsdurchführung lag das Anfangsniveau des Anteils der apoptotischen Zellen bei allen Partikelchargen in Inkubation B deutlich niedriger.

3.5. Abgleich der *in vitro* Daten mit Patientenblut

In diesem abschließenden Versuchsteil sollte überprüft werden, ob sich die an Kulturzellen und an künstlich hergestellten Tumorzell-Leukozytengemischen erhobenen Daten auf Patientenblut übertragen lassen. Dazu wurden die im Blut zirkulierenden Tumorzellen von Brustkrebspatientinnen der Universitätsfrauenklinik Jena bestimmt. Dies erfolgte in Zusammenarbeit anderer Forschungsgruppen des onkologischen Labors Jena mittels Laser Scanning Cytometrie (siehe 2.7.). Waren genügend Tumorzellen detektiert, wurde die Blutprobe (EDTA-Monovette) in gewohnter Weise aufgearbeitet, Erythrozyten lysiert und die Zellzahl bestimmt. 1×10^7 Zellen, in PE gelöst, wurden zur Weiterverarbeitung in ein extra Tube pipettiert. Geplant war die spätere Untersuchung der Zellen der Positivfraktion mittels FACS (siehe Abb. 22). Aus diesem Grunde mussten die Proben vor Durchführung der Magnetseparation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (12,5 µl Anti-HEA (EpCAM)-FITC zur Markierung der Tumorzellen und 2,5 µl CD 45-PE zur Markierung von Leukozyten) 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert werden. Anschließend erfolgte die Magnetseparation (nur 8 Minuten Inkubationszeit, $2,5 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz) mit Nanopartikeln verschiedener Umhüllungen. Nach Zellzählung wurde die Positivfraktion mittels FACS reevaluiert (Abb. 23). Damit sollte festgestellt werden,

aus welchen Anteilen von Tumorzellen und Leukozyten sich die Positivfraktion zusammensetzte, wie effektiv die Tumorzellabreicherung also ausfiel.

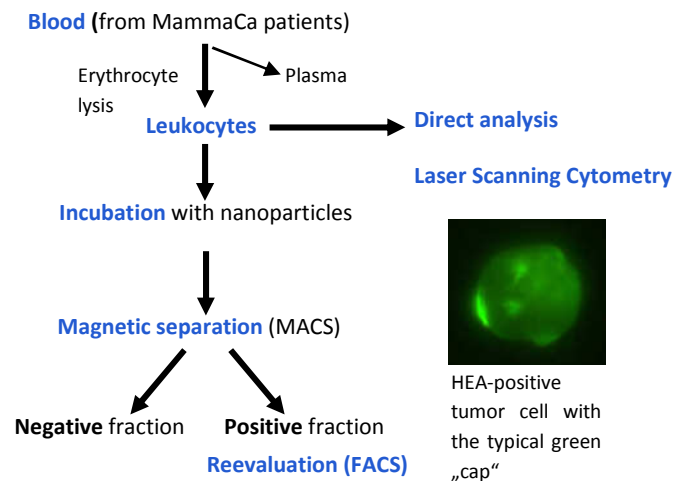


Abbildung 22: „Fahrplan“ der *ex vivo* Experimente modifiziert nach Schwalbe M et al. 2006. Magnetic tumor cell depletion from peripheral blood. [Poster].

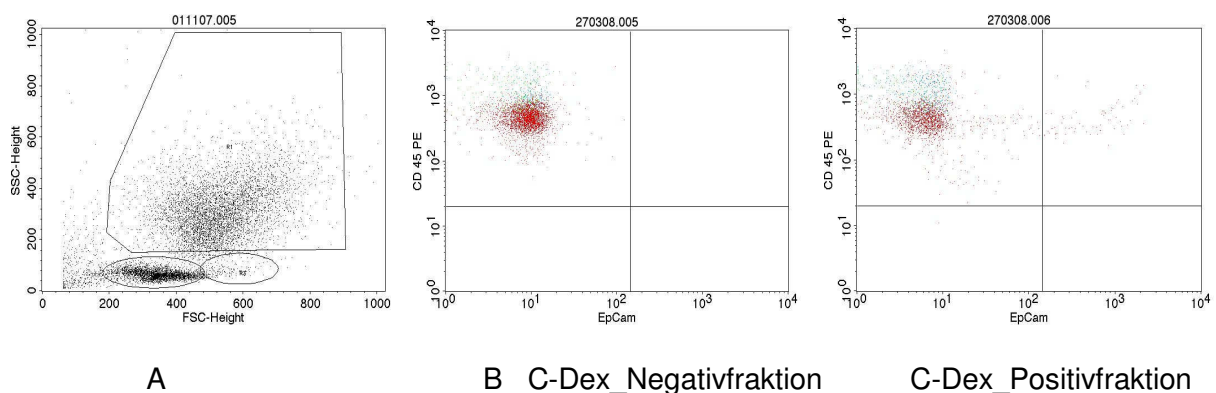


Abbildung 23: (A) Markierung (R1-3) aller Leukozytensubpopulationen für die weitere Analyse; (B) Beispiel einer Negativfraktion; (C) Beispiel einer Positivfraktion mit angereicherten EpCAM-positiven Zellen im rechten oberen Quadranten

Die erhaltenen Daten aus LSC, FACS und der Zellzählung wurden rechnerisch unter Zuhilfenahme von Microsoft Excel aufgearbeitet. Zunächst wurde die Anzahl der per LSC gemessenen Tumorzellen pro ml Patientenblut auf die Gesamtzellzahl der Blutprobe bezogen und daraus ein LSC-basierter Tumorzellanteil errechnet. Nach erfolgter Separation wurde die Anzahl an Zellen in Positiv- und Negativfraktion bestimmt und anschließend durch FACS der darin vorliegende Tumorzellanteil

festgestellt. Hieraus ließ sich nun FACS-basiert die Anzahl der Tumorzellen in Positiv- und Negativfraktion berechnen. Mit Hilfe des t- Tests (zweiseitig, gepaart) zwischen den Datengruppen Tumorzellzahl in der Positivfraktion und Tumorzellzahl in der Negativfraktion wurde die Tumorzellanreicherung statistisch beurteilt.

3.5.1. Abgleich der *in vitro* Daten mit Patientenblut - Einsatz der eigenumhüllten Partikel

Nanopartikel mit Hüllen aus Dextran, Carboxy-Dextran, Carboxymethyl-Dextran und Carboxymethyl-Cellulose wurden zur Analyse von insgesamt 7 Patientenproben eingesetzt. Unter Verwendung aller Partikel konnte eine Tumorzellanreicherung in der Positivfraktion gegenüber der Negativfraktion verzeichnet werden (Abb. 24).

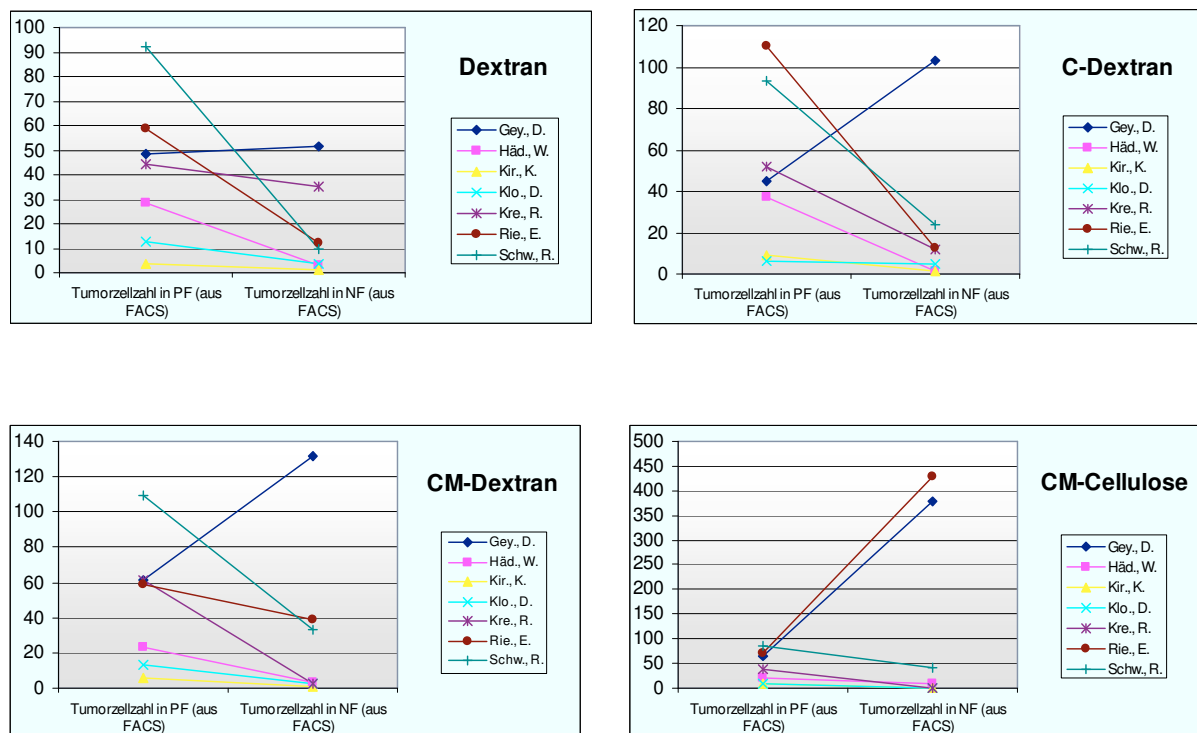


Abbildung 24: Tumorzellanreicherung in den Positivfraktionen (PF) gegenüber den Negativfraktionen (NF) der Patientenproben im Vergleich aller Nanopartikel, C Carboxy-, CM Carboxymethyl-

Eine Patientenblutprobe (Gey., D.) zeigte streng gegenläufige Werte beim Einsatz aller Partikel, auch daraus berechnete Zahlenwerte erschienen nicht plausibel. Ursachen dafür blieben unbekannt, die Probe wurde von weiteren Berechnungen und Graphiken ausgeschlossen. Es bestand eine signifikante Tumorzellanreicherung in der Positivfraktion gegenüber der Negativfraktion unter Verwendung von Dextran-

Partikeln ($p= 0,06$), Carboxy-Dextran-Partikeln ($p= 0,04$) und Carboxymethyl-Dextran-Partikeln ($p= 0,04$). Beim Einsatz von Carboxymethyl-Cellulose-Partikeln wurden in der Blutprobe Rie., E. nach erfolgter Separation deutlich mehr Tumorzellen in der Negativfraktion gefunden. Dieser Nanopartikel führt nicht zur statistisch signifikanten Tumorzellanreicherung ($p= 0,55$). Dennoch deuten sich in den verbleibenden 5 Blutproben Tendenzen für eine erfolgreiche Tumorzellanreicherung an. In Abb. 25 links ist die Tumorzellanreicherung im Partikelvergleich unter Angabe von Mittelwert und Standardabweichung graphisch erfasst. Der rechte Bildteil veranschaulicht die Partikel Aufnahme oder –beladung in allen Blutzellen (Leukozyten und Tumorzellen) der Patientenproben. Alle vier eigenumhüllte Nanopartikel werden in annähernd gleichem Maße gut aufgenommen.

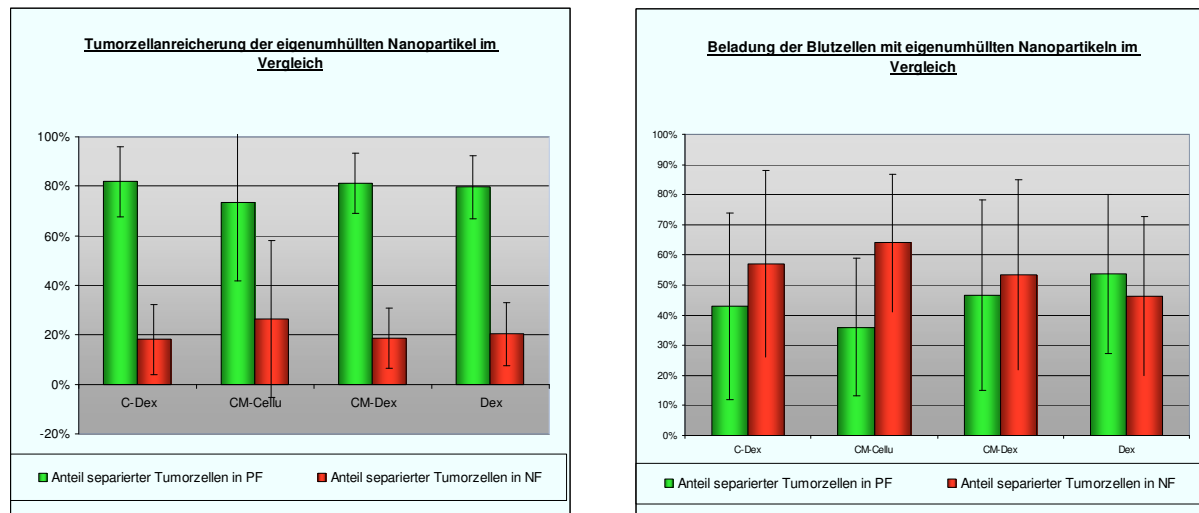


Abbildung 25: Gegenüberstellung der möglichen Tumorzellanreicherung (links) sowie der allgemeinen Partikel Aufnahme in Blutzellen (Leukozyten und Tumorzellen, rechts) im Vergleich der Nanopartikel, Dex Dextran, C-Dex Carboxy-Dextran, CM-Dex Carboxymethyl-Dextran, CM-Cellu Carboxymethyl-Cellulose, PF Positivfraktion, NF Negativfraktion

3.5.2. Abgleich der *in vitro* Daten mit Patientenblut - Einsatz der Innovent-Partikel

Innovent-Partikel mit den Umhüllungen Carboxymethyl-Dextran, Amino-Dextran, Carboxymethyl- γ -Cyclodextrin und Carboxymethyl- β -Cyclodextrin wurden zur Untersuchung von 6 Blutproben genutzt. Außer beim Einsatz von Amino-Dextran-umhüllten Nanopartikeln ist eine Anreicherung von Tumorzellen aus der Patientenblutprobe in der Positivfraktion möglich. Unter Verwendung von

Carboxymethyl-Dextran ($p= 0,13$), Carboxymethyl- γ -Cyclodextrin ($p= 0,11$) und Carboxymethyl- β -Cyclodextrin ($p= 0,12$) ließen sich jeweils mehr Tumorzellen in der Positiv- als in der Negativfraktion nachweisen, wobei sich dieser Unterschied aber als nicht signifikant darstellt (Abb. 26).

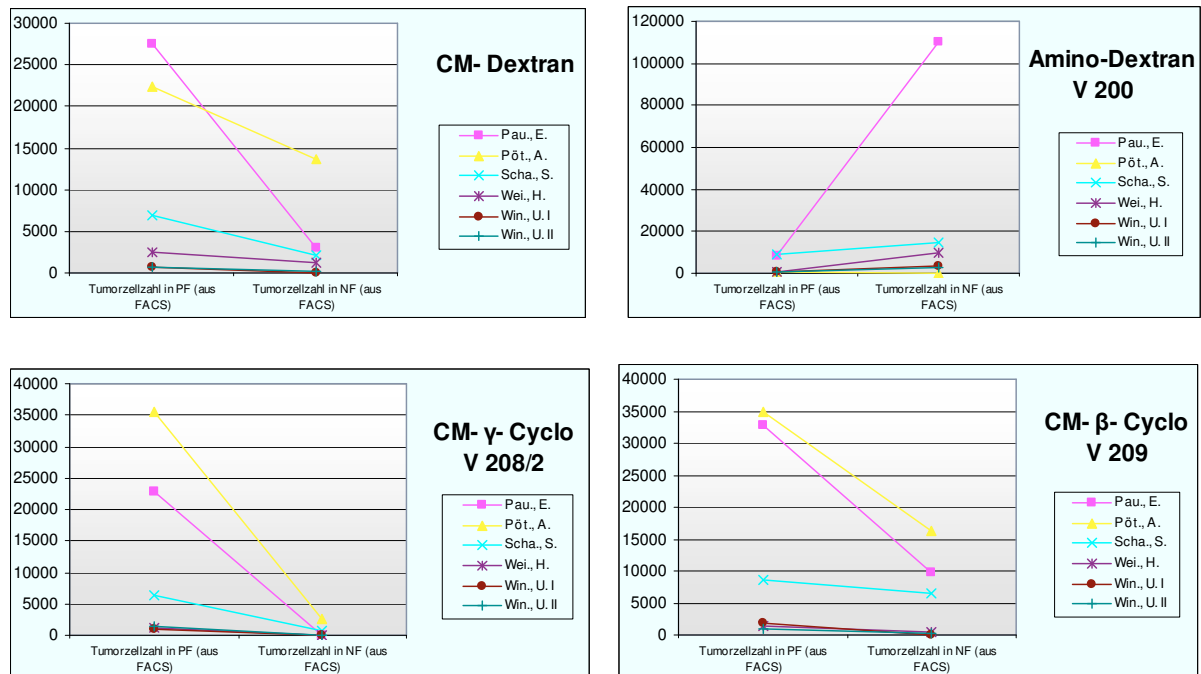


Abbildung 26: Tumorzellanreicherung in den Positivfraktionen (PF) gegenüber den Negativfraktionen (NF) der Patientenproben im Vergleich aller Nanopartikel, C Carboxy-, CM Carboxymethyl-, Cyclo Cyclodextrin

In Abb. 27 links ist wiederum die Tumorzellanreicherung im Partikelvergleich unter Angabe von Mittelwert und Standardabweichung graphisch erfasst. Der rechte Bildteil veranschaulicht die Partikelaufnahme oder –beladung in allen Blutzellen (Leukozyten und Tumorzellen) der Patientenproben. Hier werden Unterschiede deutlich. Während die Carboxymethyl- γ -Cyclodextrin- und Carboxymethyl- β -Cyclodextrin-umhüllten Nanopartikel in hohen Anteilen von den Blutzellen aufgenommen werden, zeigen Amino-Dextran-Partikel nur sehr geringe Beladungsraten.

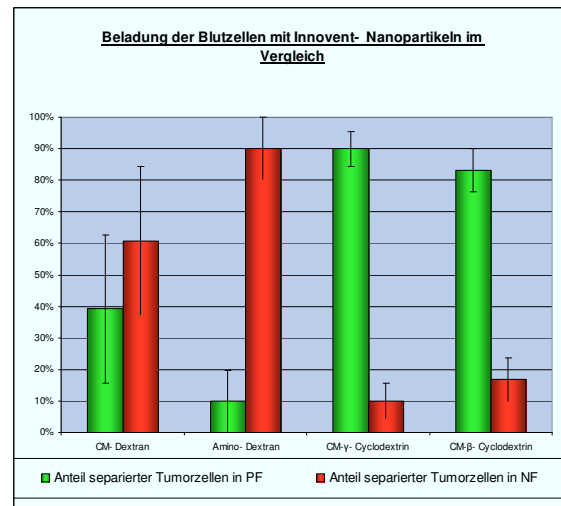
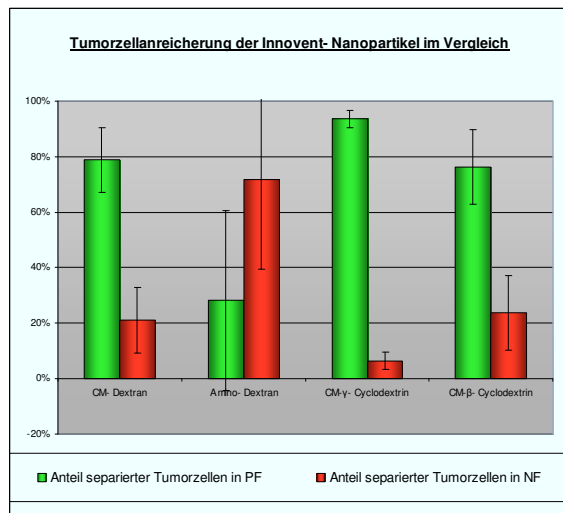


Abbildung 27: Gegenüberstellung der möglichen Tumorzellanreicherung (links) sowie der allgemeinen Partikelaufnahme in Blutzellen (Leukozyten und Tumorzellen, rechts) im Vergleich der Nanopartikel, CM Carboxymethyl, PF Positivfraktion, NF Negativfraktion

Zusammenfassend ist in diesem abschließenden Versuchsteil festzustellen, dass die Tumorzellanreicherung aus venösem Vollblut betroffener Krebspatienten experimentell möglich ist. Durch Magnetseparation mit Dextran-, Carboxy-Dextran- und Carboxymethyl-Dextran-umhüllten Nanopartikeln sind die Anteile von Tumorzellen in der Positivfraktion sogar signifikant höher als in der Negativfraktion. Unter Verwendung von Carboxymethyl-Dextran, Carboxymethyl-γ-Cyclodextrin und Carboxymethyl-β-Cyclodextrin als Hüllsubstanz sind jeweils mehr Tumorzellen in der Positiv- als in der Negativfraktion nachweisbar, wobei sich dieser Unterschied aber als nicht signifikant darstellt. Amino-Dextran-Partikel hingegen erscheinen ungeeignet, denn sie werden von Tumorzellen und Leukozyten nur sehr schlecht aufgenommen.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von verschiedenen Polysaccharidhüllen magnetischer Nanopartikel auf die magnetische Markierung von Tumorzellen und Leukozyten untersucht. Ziel ist es, im Blut zirkulierende Tumorzellen spezifisch zu markieren und effektiv in der Positivfraktion der Magnetseparation anzureichern. Leukozyten sollen dabei maximal geschont werden und nur in minimalen Anteilen in der Positivfraktion auftreten. Angereicherte zirkulierende Tumorzellen könnten so effektiv aus dem Blut Erkrankter entfernt werden, was eine Reduktion des Metastasenrisikos bedeuten würde und damit Einfluss auf den Krankheitsverlauf hätte. Dazu war es von Bedeutung, magnetische Nanopartikel mit verschiedenen Hüllstrukturen zu testen, um eine Auftrennung von gesunden Zellen und Tumorzellen optimieren zu können. Die Experimente wurden an Reinkulturen von Tumorzellen und Leukozyten, definierten Mischungen aus beiden Zellpopulationen sowie an Patientenblut durchgeführt.

Magnetic Activated Cell Sorting wurde als schnelles, flexibel einsetzbares und effizientes Verfahren zur Zellsortierung etabliert (Miltenyi et al. 1990). Zunächst wurden antikörpergekoppelte Magnetpartikel (MicroBeads) vor allem in der Immunologie zur Auftrennung der Lymphozytenpopulationen, basierend auf deren Expression von Oberflächenantigenen (Cluster of Differentiation), eingesetzt (Semple et al. 1993). Mit der Kopplung an Antikörper gegen Oberflächenantigene epithelialer Zellen war die Detektion zirkulierender Tumorzellen möglich (Wong et al. 1995). In der Weiterentwicklung - der Nutzung Anti-Zytokeratin-gekoppelter Beads - stand ein wertvolles Werkzeug für die Quantifizierung und molekulare Charakterisierung von Tumorzellen zur Verfügung (Martin et al. 1998). Im Rahmen dieser Forschungen wurde klar, dass es zur Verbesserung der Sensitivität und Kapazität der Analysen sinnvoll ist, Tumorzellen zunächst anzureichern, bevor spezifische Nachweismethoden wie FACS, PCR oder Immunfluoreszenz Anwendung finden. In einem neuen Forschungsansatz wurde auf die Kopplung der Magnetpartikel mit Antikörpern verzichtet. In unserem Labor konzentrierten sich die Arbeiten auf die Modifikation der Hüllstrukturen (Schwalbe et al. 2005, Schwalbe et al. 2006a, Schwalbe et al. 2006b). Es wurde gezeigt, dass zuckerumhüllte magnetische Nanopartikel in Tumorzellen als auch in Leukozyten aufgenommen werden (Wagner

et al. 2004). Dieser Prozess führt innerhalb von wenigen Minuten zur magnetischen Markierung der Zelle und ermöglicht die anschließende magnetbasierte Separation.

In der Fehlerbetrachtung des MACS-Verfahrens sind verschiedene Ansätze zu berücksichtigen. So sind nicht spezifische Adhäsionen der Zellen an der Säulenwand und damit das Zurückhalten unmarkierter Zellen möglich (Molday et al. 1982). Bei der Separation von Patientenblutproben können Megakaryozyten und atypische Monozyten Quellen falschpositiver Resultate sein (Wong et al. 1995). Zur Tumorzellseparation sollte Beachtung finden, dass die Tumorzellaussaat in die Körperperipherie ein dynamischer, fluktuierender Prozess ist und dass deshalb oft keine zirkulierenden Tumorzellen in Krebspatienten zu einem bestimmten Zeitpunkt nachweisbar sein können (Mayhew und Glaves 1984). Weil sich die Tumorzelldichte in Blut- und Knochenmarkproben von der einer Zelllinie aber unterscheidet, sind die Wiederauffinderaten von Tumorzellen in Patientenproben wahrscheinlich niedriger (Moreno et al. 1992). Ebenfalls wird eine große Heterogenität der Tumorzellen in Größe und Morphologie beschrieben, so dass Nachweisverfahren eine große Streuung zeigen können (Martin et al. 1998). Moore et al. stellten die Aufnahme von Magnetpartikeln sogar nur bei sich teilenden Tumorzellen fest (Moore et al. 1997). In der MACS-Durchführung ist darauf zu achten, das zu trennende Zellgemisch behutsam zu pipettieren, die Säule vorsichtig zu spülen und den Stempel der Separationssäule langsam herunterzudrücken, um Zellverluste durch mechanische Faktoren gering zu halten. Nichtsdestotrotz sind die Verluste - besonders der isolierten Leukozyten - mit Werten um 30-40 % hoch und geben Raum für Weiterentwicklungen der Verfahrenstechnik. Es bestand die Hoffnung, dass Zellverluste, die durch die Säule selbst bedingt sind, durch Anwendung einer Beutelseparation umgangen werden könnten (Bornmann 2008). Dazu wurde das aufzutrennende Zellgemisch durch einen sich in einem Magnetfeld befindlichen Beutel laufen gelassen. Die Erwartungen, dass die Ausbeuten bei der Beutelseparation konstanter sind und die Zellverluste geringer ausfallen, wurden aber bisher nicht erfüllt. Markierte Zellen agglomerierten stark und blieben in diesem Zustand häufig an der Beutelinnenfläche haften. Es bleibt festzuhalten, dass die hohen Verluste durch das Zusammenwirken unterschiedlichster Faktoren (z.B. Inkubation mit Nanopartikeln, Prozedur der Säulenseparation, Zentrifugationsschritte, Zellisolation in Pufferlösung) begründet werden können.

Ziel der Magnetseparation mit zuckerumhüllten Nanopartikeln ist eine Reduktion der im Blut zirkulierenden Tumorzellen. Nach dem heutigen Stand der Forschung bedeutet dies eine Reduktion des Metastasenrisikos (Cristofanilli et al. 2004, Braun und Pantel 2000, Diel et al. 1996). Dafür ist es essentiell, disseminierte Tumorzellen zu identifizieren und aus der Blutzirkulation zu entfernen. Zukünftig könnte dies mit einer Apherese geschehen (Abb. 28): Blut wird dem Patienten entnommen, durch den Einsatz magnetischer Nanopartikel werden Tumorzellen markiert und mit Hilfe der magnetischen Zellseparation (MACS) separat angereichert und entfernt, anschließend erfolgt die Retransfusion der gereinigten Blutkomponenten - vor allem der Leukozyten.

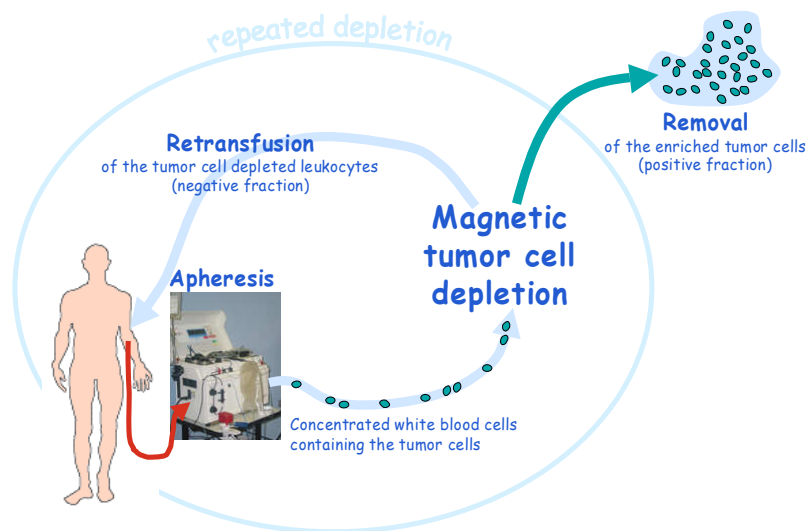


Abbildung 28: Modell "Magnetic tumor cell depletion from peripheral blood" von Schwalbe M, Jörke C, Wagner K, Pachmann K, Buske N, Schnabelrauch M, Höffken K, Clement JH [Poster], 2006

Diese Methode müsste zwei Voraussetzungen erfüllen: einen hohen Grad der Abreicherung von disseminierten Tumorzellen und dabei ein Minimum an Verlust von Leukozyten - besonders der immunkompetenten Lymphozyten. Aus diesem Grunde ist eine optimale Diskriminierung von Tumorzellen und Leukozyten mittels magnetischer Nanopartikel notwendig. Weitere Forschungen zur Minimierung des Zellverlustes, die Gewährleistung von Sterilität und Stabilität der Partikellösungen, Erkenntnisse zum Verhalten der Magnetpartikel in der Blutbahn (z.B. Wechselwirkung mit Plasmaproteinen) und Langzeitstudien über Einflüsse auf den Eisenhaushalt sind nötig, ehe die Idee der Plasmapherese Eingang in die Praxis

finden könnte. Auch ist das MACS-Verfahren für einen hohen Zelldurchsatz, wie er bei der Apherese erforderlich wäre, noch nicht geeignet.

In dieser Arbeit kamen verschiedene Magnetpartikel, bestehend aus einem Magnetit/Maghemit-Kern (durchschnittliche Größe von 5 nm) und einer spezifischen Polysaccharidhülle zum Einsatz. Ferromagnetische Eisenpartikel mit Dextran-Hülle haben sich schon früh als extrem stabil erwiesen (Molday et al. 1982, Lacava et al. 2001). Sie aggregieren kaum während der Zellmarkierungsprozedur. Die dichte Dextran-Umhüllung verleiht den Magnetpartikeln eine extrem hydrophile Oberfläche, eine entscheidende Voraussetzung für die Zirkulation im Blutkreislauf. Hydroxylgruppen an der Partikeloberfläche können zusätzlich zur kovalenten Bindung von Proteinen oder anderen spezifischen Liganden genutzt werden und eine selektive Isolation von Zielzellen aus Vollblut ermöglichen (Flohr et al. 2002). Neben Stabilität verleiht die Dextranhülle den Magnetpartikeln Biokompatibilität (Moore et al. 1997). Im menschlichen Organismus ist eine Partikelaufnahme nicht nur auf professionelle phagozytierende Zellen (z.B. Makrophagen in Leber, Milz, Lymphknoten, Knochenmark) begrenzt, sondern auch in andere Parenchymzellen (z.B. Neurone) möglich (Moore et al. 1997). Carboxymethyl-Dextran-umhüllte Nanopartikel haben daneben die Fähigkeit mit Tumorzellen zu interagieren (Berry et al. 2003, Berry et al. 2004a, Raynal et al. 2004).

Die Stabilität der Dextranhülle ist nur für eine begrenzte Zeit gewährleistet, was eine Herausforderung für Weiterentwicklungen darstellt. Es existiert jedoch die Möglichkeit der Neuumhüllung. Die Neuumhüllung der Magnetpartikel erfolgte nach einem in unserer Arbeitsgruppe um Dr. Manuela Schwalbe etablierten Verfahren. Es ist dabei zu beachten, dass Leitungswasser aufgrund seiner Ionenzusammensetzung anstelle von destilliertem Wasser verwandt wurde und die entstandenen Partikellösungen deshalb als nicht steril anzusehen sind. Fertige Nanopartikel haben in wässriger Lösung einen in früheren Arbeiten beschriebenen hydrodynamischen Durchmesser von 200-300 nm (Wotschadlo 2006). Nach einigen Monaten kommt es zum Zerfall der Zuckerhülle und zum Verlust der zelltypspezifischen Interaktionsfähigkeit. Dann werden die Magnetpartikel von Tumorzellen als auch von Leukozyten unabhängig von der Zeit in gleichem Maße stark aufgenommen, was eine Unterscheidung der Zellen unmöglich macht. Mit der Neuumhüllung erlangen Nanopartikel die zelltypspezifische Interaktionsfähigkeit zurück. Nur so können die

Versuchsbedingungen über einen längeren Zeitraum konstant gehalten werden. Jede neue Partikelcharge wurde vor ihrem Einsatz in Experimenten getrennt an Tumorzellen und Leukozyten auf Funktionsfähigkeit getestet.

Zuckerumhüllte magnetische Nanopartikel werden in Tumorzellen als auch in Leukozyten aufgenommen (Wagner et al. 2004). Dies ist ein rascher Prozess, der innerhalb von wenigen Minuten zur magnetischen Markierung der Zelle führt und die anschließende magnetbasierte Separation ermöglicht. Dieser Vorgang ist in parallel verlaufende Teilschritte untergliedert. Zunächst kommt es zur Anlagerung der umhüllten Partikel an die Zelloberfläche der Zielzelle. Durch Wechselwirkungen zwischen Zuckerhülle und Plasmamembran haften die Magnetpartikel, werden endozytotisch aufgenommen und liegen letztendlich in membranumschlossenen Kompartimenten (Phagosom, Lysosom) vor. Die Endozytoserate ist durch viele Faktoren beeinflussbar z.B. Temperatur, Partikelkonzentration und –größe, Interaktion der Partikelhülle mit der Zellglykokalix, Opsonierung der Magnetpartikel, Zustand der Zielzellen. Durch die Etablierung standardisierter Versuchsbedingungen (z.B. konstante Inkubationstemperatur, konstantes Partikel- und Probenvolumen, Verzicht auf Zugabe von humanem Blutplasma) sollen diese minimiert werden. Daraus ergibt sich in jeder Zelle ein Gradient der Partikelbeladung mit an der Zelloberfläche angelagerten und/oder bereits intrazellulär aufgenommenen Partikeln, der darüber entscheidet, wann das magnetische Potential der Zielzelle groß genug ist, um im Magnetfeld in der Säule des Magnet-Separators zurückgehalten zu werden. Ist dies der Fall, können die so magnetisch markierten, zurückgehaltenen Zellen als Positivfraktion isoliert werden. Fasst man die allgemeinen Wechselwirkungen von Nanopartikeln und Zellen zusammen, so wäre ein idealer Nanopartikel gekennzeichnet durch niedrige Herstellungskosten, eine hohe endozytotische Aufnahmefähigkeit in die Zellen und eine geringe Größe, um der Opsonierung und Eliminierung durch das retikuloendotheliale System zu umgehen. Wären an der Partikeloberfläche zusätzlich Liganden gekoppelt, so wären eine stabile Konjugatbildung und hohe Affinität zu Oberflächenrezeptoren weitere wichtige Eigenschaften (Berry 2004b).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Tumorzelllinie MCF7 zur Durchführung der Experimente verwandt. Ihr früherer Einsatz zeigte die Eignung zur Magnetseparation, denn Magnetpartikel werden von diesen Tumorzellen rasch aufgenommen und

Unterschiede zu Leukozyten, die sich durch eine verlangsamte Interaktion auszeichnen, werden besonders gut deutlich. In Arbeiten von Clement et al. nahmen MCF7-Zellen im Vergleich mit anderen Tumorzelllinien deutlich höhere Anteile von Carboxymethyl-Dextran umhüllten magnetischen Nanopartikeln auf, was ihre Verwendung begründet (Clement et al. 2006). Ein unterschiedliches Verhalten der Zellkulturzellen abhängig von deren Passage und den Kultivierungsbedingungen ist dabei aber nicht auszuschließen. Es ist beschrieben, dass diese Zelllinie zur optimalen Magnetseparation nur subkonfluent wachsen sollte. MCF7-Zellen haben ihre Kontaktinhibition noch nicht völlig verloren und gehen bei zu dichtem Wachstum in einen Ruhezustand über (Bornmann 2008). Die Zeltypspezifität der Partikelaufnahme könnte durch verschiedene Membran-„turn-over“-Zeiten der Zielzellen bedingt sein. Im Allgemeinen haben Tumorzellen eine höhere „turn-over“-Rate als Normalzellen (Aiken und Gillies 1996), was als mögliche Erklärung für die schnellere Markierung der MCF7 dient. Es ist aber darauf hinzuweisen, dass sich Krebszellen im Tumorgewebsverband oder ausgesät in der Blutbahn anders verhalten können als die für Forschungszwecke kultivierten Zellen. So spielen Umgebungsfaktoren im menschlichen Organismus (z.B. intratumoraler Druck, Plasmakonzentration) eine nicht zu unterschätzende Rolle und beeinflussen die endozytotische Partikelaufnahme mit hoher Wahrscheinlichkeit.

Experimente mit primären Zellen (Leukozyten) wurden den kultivierten Tumorzellen gegenübergestellt. Die Isolierung der Spenderleukozyten fand bevorzugt aus Vollblut aus NH₄-Heparin-Monovetten statt. In der klinischen Routine finden jedoch größtenteils EDTA-antikoagulierte Monovetten Anwendung, so dass für die Experimente mit Patientenblut darauf zurückgegriffen werden musste. Es ist zu beachten, dass Reste von EDTA zur Verklumpung der eisenhaltigen Partikel führen und die Separationsergebnisse beeinflussen können. Deshalb erfolgt die Zugabe des Erythrozytenlyse-Puffers, Zentrifugation der Probe und Abnahme des Überstands in wiederholter Ausführung. Ebenfalls erhofft man sich damit, eine höhere Leukozytenausbeute zu erzielen. Isolierte Leukozyten wurden zügig weiterverarbeitet, da sie zu Aggregationen neigen und dann falsche Mengenberechnungen ergeben. Wurden Verklumpungen mit bloßem Auge sichtbar und konnten nicht durch Schütteln gelöst werden, wurde das Lysat verworfen und auf die Aufarbeitung einer anderen Vollblutprobe zurückgegriffen. Bekannte, hohe Zellverluste in der

Magnetseparation können zum Teil auf die Empfindlichkeit der Leukozyten zurückgeführt werden.

Die Interaktion von magnetischen Nanopartikeln mit einzelnen Zellen wird durch unterschiedliche Umgebungsparameter beeinflusst (Chouly et al. 1996, Wilhelm et al. 2003). So führte PE-Puffer (PBS + 2 mM EDTA) zu höheren Markierungsraten als PBS allein (Clement et al. 2006). Die Temperatur wurde während der Inkubation der Proben im Wärmeblock mit 37°C konstant gehalten und den Körperbedingungen angepasst, denn die Endozytose stellt einen temperaturabhängigen Vorgang dar. Unter gekühlten Umständen versteift sich die Fluid-Mosaik-Struktur der Zellmembran, ihre Flexibilität verringert sich stark und alle membrangekoppelten Mechanismen, wie die Endozytose, werden auf ein Minimum reduziert. Die Mengen der eingesetzten Zellen pro Versuchsansatz (Tumorzellen 1×10^6 und Leukozyten $2,5 \times 10^6$) sowie der zugefügten Nanopartikellösung (2,5 µl) wurden standardisiert. Auf den Zusatz von humanem Plasma als regulierenden Faktor wurde generell verzichtet und ein eigener Versuchsteil, der den Plasmaeinfluss auf die Tumorzellanreicherung untersucht, etabliert.

Unter standardisierten Inkubationsbedingungen wurde alle 4 Minuten die Separation eines Probenansatzes durchgeführt. Bedingt durch den langsamen Durchfluss der Zellen durch die Säule, den Spülschritt, das Auswechseln der Röhrchen zum Auffangen der Positiv- und Negativfraktion und das Entleeren der Säule mit dem Stempel sind kürzere Zeitabstände nicht möglich. Es ergeben sich damit Inkubationszeiten von 0, 4, 8, 12 und 16 Minuten. Tumorzellen nehmen rasch Magnetpartikel auf und zeigen bereits zu Beginn der Inkubationszeit hohe Markierungsraten. Mit zunehmender Inkubationszeit steigen diese noch weiter an. Leukozyten nehmen magnetische Nanopartikel verlangsamt auf, ziehen aber mit steigender Inkubationszeit stark in der Partikelaufnahme nach. Aus diesem Grund werden Leukozyten zusätzlich bis 20 Minuten Inkubationszeit separiert. Es muss folglich eine optimale Inkubationszeit gefunden werden, bei der der Unterschied zwischen bereits markierten Tumorzellen und kaum markierten Leukozyten am größten ist. In Vorarbeiten war die bestmögliche Trennung von Tumorzellen und Leukozyten in einem Zeitbereich von 4 bis 8 Minuten möglich (Schwalbe et al. 2005, Schwalbe et al. 2006a, Schwalbe et al. 2006b).

In einem Versuchsteil wurden die Interaktionen von magnetischen Nanopartikeln mit reinen Tumorzell- und Leukozytenkulturen erörtert. Beim Einsatz aller vier eigenumhüllten Magnetpartikel (Dextran, Carboxy-Dextran, Carboxymethyl-Dextran und Carboxymethyl-Cellulose) lässt sich deutlich eine Lücke zwischen schneller, maximaler Partikelaufnahme in den Tumorzellen und langsamer, kontinuierlich ansteigender Partikelaufnahme der Leukozyten darstellen. Nach 4-minütiger Inkubation scheint dieses Unterscheidungsmerkmal am deutlichsten ausgeprägt zu sein, weil hier bereits die Mehrheit der Tumorzellen mit Nanopartikeln beladen sind, der Anteil der markierten Leukozyten aber gerade erst am Ansteigen ist. Man kann daraus schließen, dass die Separation eines Tumorzell-Leukozytengemisches besonders nach 4-minütiger Inkubationszeit eine hohe Trennschärfe verspricht. In der Klinik wäre diese Tatsache von hoher praktischer Relevanz, denn je größer diese Lücke ist, desto genauer wäre die Abtrennung von Tumorzellen aus Patientenblut möglich. Carboxymethyl-Dextran-Nanopartikel werden favorisiert, denn damit wurden die höchsten Aufnahmeraten in Tumorzellen (bis 70 %) bei gleichzeitig niedrigen Leukozytenmarkierungen (maximal 30 % am Ende der Inkubation) erzielt. Carboxymethyl-Cellulose-Partikel weisen in ihrem Aufbau β -1 \rightarrow 4-glykosidische Bindungen auf, was die Flexibilität des Moleküls beeinflusst und möglicherweise zu geringeren Markierungsraten führen und die schwankenden Ergebnisse in dieser Arbeit begründen könnte (Wotschadlo et al. 2009).

Keiner der weiteren Kern-Hülle-Teilchen (Amino-Dextran-, Carboxymethyl-Chitosan-, Carboxymethyl- γ -Cyclodextrin- und Carboxymethyl- β -Cyclodextrin-Partikel) lässt sich mit den optimalen Trennungseigenschaften von Carboxymethyl-Dextran vergleichen. Mit Ausnahme von Amino-Dextran-Partikeln werden sowohl Tumorzellen als auch Leukozyten gleichstark beladen - völlig unabhängig von der Inkubationszeit. Eine Zelldiskriminierung scheitert. Amino-Dextran-umhüllte Nanopartikel werden nur minimal in Leukozyten aufgenommen (unter 10 %), was eigentlich einen Separationsvorteil darstellen würde. Aber auch die Beladung der Tumorzellen liegt mit Maximalwerten um 30 % auf einem niedrigen Niveau, was schlussfolgern lässt, dass das Zuckerderivat mit Amino-Gruppe generell schlecht aufgenommen werden kann. Diese Annahme bestätigte sich in den weiteren Versuchen und könnte auf negative Wechselwirkungen der gekoppelten Amino-Gruppe mit der Zelloberfläche zurückzuführen sein.

Zur Untersuchung der Tumorzellanreicherung aus einem definierten Gemisch von Tumorzellen und Leukozyten wurden Experimente mit verschiedenen umhüllten Nanopartikeln ohne die Zugabe von humanem Blutplasma durchgeführt. Im Vergleich aller eingesetzten Nanopartikel (Dextran, Carboxy-Dextran, Carboxymethyl-Dextran und Carboxymethyl-Cellulose) sind unter Verwendung von Carboxymethyl-Dextran-Partikeln Maximalwerte der Partikelaufnahme in MCF7 erreichbar bei gleichzeitig vorliegenden geringsten Beladungsraten der Leukozyten. Dies ergibt wiederum die günstigsten Voraussetzungen zur Auftrennung eines Tumorzell-Leukozytengemisches. Mit allen eigenumhüllten Nanopartikeln ist eine Tumorzellanreicherung in der Positivfraktion um den Faktor 3-4 möglich. Positiv ist auch der gleichbleibend hohe Anteil der Leukozyten in den Negativfraktionen (stets über 95 %), was deren Schonung bedeutet. Dies wäre essentiell für eine hypothetisch geplante Retransfusion der weißen Blutkörperchen in den abwehrgeschwächten Patienten. Dieser Versuch bestätigt die Eignung magnetischer Nanopartikel zur Tumorzellanreicherung aus einem blutähnlichen Zellgemisch. Ziel ist eine weitere Steigerung der Tumorzellanreicherungsraten.

In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von humanem Plasma zu den Versuchsansätzen Einfluss auf das Ergebnis der magnetischen Separation nimmt. Humanes Plasma wurde als regulierender Faktor, der zur reduzierten Partikelaufnahme führt, identifiziert. Davon waren besonders Leukozyten betroffen, schon 1 % Plasmazusatz führte zur Reduktion der Partikelbeladung um über 60 % gegenüber einer plasmafreien Inkubation. MCF7-Zellen hingegen zeigten sich geringer beeinflusst, erst bei Zugabe höherer Plasmaanteile (ab 5 %) wurde deren Reduktion in der Positivfraktion detektiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde lediglich der Einfluss von 2,5 % humanem Blutplasma untersucht und mit der Tumorzellanreicherung unter plasmafreien Inkubationsbedingungen verglichen. Dabei konnten die oben genannten Ergebnisse bestätigt werden. Durch Plasmazugabe kam es zur reduzierten Nanopartikelbeladung in Tumorzellen (MCF7) und Leukozyten. Die Anreicherung von MCF7 in der Positivfraktion ist im Durchschnitt um 10-15 % reduziert - mit Ausnahme des Einsatzes von Carboxy-Dextran-Nanopartikel, hier ergab die Plasmazugabe kaum Veränderungen. Auch die maximal mögliche, errechnete Tumorzellanreicherung in der Positivfraktion zeigte sich – mit Ausnahme der Carboxy-Dextran-Nanopartikel - durch Plasmazugabe reduziert. Es sollte jedoch Beachtung finden, dass jeweils nur 2

Versuche pro Magnetpartikel durchgeführt wurden und die daraus gewonnenen Ergebnisse nicht verallgemeinert werden können. Vom Plasmazusatz weitaus stärker beeinflusst zeigten sich Leukozyten, deren Anteil in der Positivfraktion von durchschnittlich 30 % auf unter 15 % absank. Dieses Verhalten stellt einen Separationsvorteil dar, da geringe Leukozytenanteile in der Positivfraktion gewünscht sind. Es ist bekannt, dass eine Interaktion mit Plasmaproteinen die Partikelaufnahme in Makrophagen und damit ihre Entfernung aus der Blutzirkulation fördert (Davis 1997). Dabei versteht man die Opsonierung als langsamen Prozess, der bei den hier eingesetzten geringen Plasmakonzentrationen ($< 5\%$) möglicherweise unterbleiben könnte. Dies könnte als Erklärung für die im Allgemeinen niedrigeren Beladungsraten von Leukozyten und Tumorzellen dienen.

Die bisher untersuchten Effekte beziehen sich auf Kurzzeitinkubationen. Mit den Zielen der Rückgabe der Leukozyten an den Patienten sowie weiterer diagnostischer Maßnahmen an den zirkulierenden Tumorzellen ist eine längere Vitalität der Zellen erforderlich. Aus diesem Grunde wurden Langzeitinkubationen magnetischer Nanopartikel mit Tumorzellen vor allem in Hinblick auf das Absterben der Zellen durchgeführt. Die Apoptose ist ein Prozess, der das Durchlaufen mehrerer Signalkaskaden beinhaltet. Nach kurzen Inkubations- und Separationszeiten von Zellen mit Magnetpartikeln können die Effekte der Apoptose noch nicht eingetreten sein. Erst nach 8-stündiger Inkubationszeit ist ein Einsatz des Apoptosemarkers Annexin V als sinnvoll beschrieben, um die Biokompatibilität von Nanopartikeln zu überprüfen (Bornmann 2008). Zellen können durch die Separationsprozedur mechanisch geschädigt oder zerstört werden. Dies ist insbesondere durch den hohen Druck, der zum Gewinnen der Positivfraktion in der Säule entsteht, der Fall. Die Zellen werden nekrotisch, was ihre Anfärbbarkeit mit dem Nekrosemarker PI zeitnah ermöglicht. Die Population der apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde zur Gruppe der nichtvitalen Zellen zusammengefasst und als solche im FACS detektiert. MCF7 ist als Tumorzelllinie durch hohe Zellteilungsraten gekennzeichnet, so dass Anteile avitaler Zellen von 25 % in der rasch wachsenden Gesamtpopulation nicht ungewöhnlich sind (persönliche Mitteilung Dr. Clement). Wird am Folgetag die Probe auf avitale Zellen hin untersucht, sind durch Ernte der Zellkulturflasche, Zentrifugations- und Separationsschritte ein Großteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen aus dem Reaktionsansatz bereits entfernt. Dies führt zu erniedrigten Anteilen an avitalen Zellen in der FACS-Untersuchung, begründbar

durch ihre einfache Entfernung. Im menschlichen Organismus werden Nanopartikel vorwiegend von zur Phagozytose befähigten Zellen, die Barrierefunktion besitzen, aufgenommen. Untersuchungen bezüglich der Zytotoxizität konzentrieren sich deshalb auf Endothelzellen, Zellen des pulmonalen und intestinalen Epithels, Alveolar- und Lebermakrophagen. Die Partikelhülle stellt ein wichtiges Merkmal für die Biokompatibilität der Nanopartikel dar. Dabei spielen vor allem die Ladung der Partikeloberfläche und ihr chemisches Reaktionsvermögen eine wichtige Rolle. Hohe Kationendichte und große Flexibilität der Hüllmoleküle ermöglichen ein einfacheres Anlagern an die Biomembranen der Zielzellen und bergen damit ein erhöhtes Risiko für zytotoxische Effekte (Ryser 1967). In anderen Arbeiten wirkten positiv geladene Amin-Nanopartikel prothrombotisch durch Aktivierung der Blutplättchen (Nemmar et al. 2002). Fernandez-Urrusuno et al. stellten fest, dass Nanopartikel, die die Leber erreichten, lokal oxidativen Stress induzierten (Fernandez-Urrusuno et al. 1997). Erfreulicherweise zeigten Zellen, die mit Carboxymethyl-Dextran-Partikeln markiert worden sind, keine Einschränkung hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften (Clement et al. 2006).

In einem finalen Schritt erfolgten *ex vivo* Analysen. Es sollte überprüft werden, ob eine Übertragung der gewonnen *in vitro* Daten auf Patientenblut möglich ist. Unter Verwendung aller eigenumhüllten Nanopartikel (Dextran, Carboxy-Dextran, Carboxymethyl-Dextran und Carboxymethyl-Cellulose) konnte eine Tumorzellanreicherung in der Positivfraktion gegenüber der Negativfraktion verzeichnet werden. Erstmals konnte bedingt durch den größeren Probenumfang eine statistische Auswertung erfolgen. Mittels t- Test wurde die Tumorzellanreicherung in der Positivfraktion gegenüber der Negativfraktion auf signifikante Unterschiede überprüft. Damit fanden sich die Ergebnisse aus dem experimentell geschaffenen Tumorzell-Leukozytengemisch bestätigt. Eine Patientenblutprobe zeigte streng gegenläufige Werte beim Einsatz aller Partikel, auch daraus berechnete Zahlenwerte erschienen nicht plausibel. Ursachen dafür blieben unbekannt, die Probe wurde von weiteren Berechnungen und Graphiken ausgeschlossen. Mögliche Fehlerquellen könnten eine zu lange Lagerung der Blutmonovetten vor der Versuchsdurchführung, Fehler bei der Aufarbeitung oder sogar ein versehentliches Vertauschen der Positiv- und Negativfraktionen bei der Separation oder FACS-Analyse sein. Weiterhin sollte Beachtung finden, dass in diesem Versuchsteil nur eine Inkubationszeit von 8 Minuten gewählt wurde. Basierend auf den Vorexperimenten wurde in einem

Zeitfenster von 4-8 Minuten Inkubation eine optimale Zelldiskriminierung erreicht. Um sicher hohe Beladungsraten zu erzielen, entschieden wir uns für die 8-minütige Inkubation. Unter Verwendung der Partikel mit Carboxymethyl-Dextran, Carboxymethyl- γ -Cyclodextrin und Carboxymethyl- β -Cyclodextrin als Hüllsubstanz sind jeweils mehr Tumorzellen in der Positiv- als in der Negativfraktion nachweisbar, wobei sich dieser Unterschied aber als nicht signifikant darstellt. Amino-Dextran-Partikel hingegen erscheinen ungeeignet, denn sie werden von Tumorzellen und Leukozyten wiederum nur sehr schlecht aufgenommen. Eine Tumorzellanreicherung aus venösem Vollblut betroffener Krebspatienten ist experimentell möglich.

5. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

In dieser Dissertation wurden verschiedene magnetische Nanopartikel zur Separation von Tumorzellen eingesetzt. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf Zuckerderivate, die die Hüllen der Magnetpartikel ausbilden, gelegt. Zur Anwendung im Sinne einer Blutaufreinigung ist es das Ziel, Tumorzellen maximal anzureichern und aus dem Blutkreislauf zu entfernen sowie Leukozyten maximal zu schonen und dem Patienten wieder zuzuführen. Die Zuckerhülle, die den Magnetpartikeln die Fähigkeit zur bestmöglichen Unterscheidung zwischen Tumorzellen und Leukozyten verleiht, galt es herauszuarbeiten. Experimente wurden zunächst *in vitro* an reinen Tumorzell- und Leukozytenkulturen getrennt durchgeführt, um die Funktionsfähigkeit der neu umhüllten Magnetpartikel zu prüfen. Diese Prozedur sollte in regelmäßigen Abständen im Sinne einer Qualitätskontrolle wiederholt werden, um die Intaktheit der Partikelhülle zu gewährleisten. Gealterte Partikel, die von Tumorzellen als auch Leukozyten gleichschnell in hohem Maße aufgenommen werden und eine Unterscheidung damit unmöglich machen, können neu umhüllt werden und ihre Funktion wiedererlangen. Für eine Diskriminierung zwischen Tumorzellen und Leukozyten sind Inkubationszeiten zwischen 4 und 8 Minuten geeignet, denn hier sind Tumorzellen bereits zu hohen Anteilen mit Magnetpartikeln beladen während Leukozyten nur geringe Aufnahmezeiten zeigen. Länger andauernde Inkubationen sind nicht zu empfehlen, denn Leukozyten nehmen dann ebenfalls verstärkt Nanopartikel auf, werden so magnetisch markiert und gehen für eine geplante Retransfusion verloren. Die recht hohen Zellverluste des Magnetic Activated Cell Sorting sind kritisch zu betrachten und geben Anlass für weitere Optimierung der Verfahrenstechnik. Besonders die empfindlichen Leukozyten müssen effektiver geschont werden, um sie dem durch die Krebserkrankung abwehrgeschwächten Patienten zurückgeben zu können. Auch ist es noch nicht möglich, große Blutmengen aufzureinigen, denn das Verfahren ist für einen hohen Zelldurchsatz nicht geeignet. Ebenfalls sind Langzeiteffekte der Nanopartikel auf den menschlichen Organismus nur im Ansatz beleuchtet, so dass die Plasmapherese noch intensiver Untersuchungen bedarf, bevor sie in die Praxis umgesetzt werden kann. Diese Arbeit diene der damit verbundenen Grundlagenforschung und unterstreicht die Favorisierung von Carboxymethyl-Dextran umhüllten Nanopartikeln zur Tumorzell-depletion. Unter Einsatz dieses Zuckerderivates wurden maximale Tumorzellanteile

in der Positivfraktion bei nur geringen Beladungsraten der Leukozyten erreicht. Dieses Ergebnis konnte auf ein experimentell erzeugtes Tumorzell-Leukozyten-gemisch übertragen werden, wobei eine 4-fache Tumorzellanreicherung in der Positivfraktion erzielt wurde. Auch beim Abgleich der erhobenen Daten mit Blut von Brustkrebspatientinnen wurden Tumorzellen unter Einsatz von Carboxymethyl-Dextran-Partikeln signifikant in der Positivfraktion angereichert. Auch hier sind umfangreichere Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv Voraussetzung für eine zukünftige Anwendbarkeit der Methode. Weiterhin gilt es zu klären, ob diese Ergebnisse auch bei Tumoren anderer Entitäten zu erzielen sind. Die verlangsamte Kinetik der Leukozyten konnte durch den Einsatz anderer Dextranderivate nicht verstärkt werden. Andere Polysaccharide als Bausteine der Hüllstrukturen (z.B. Amino-Dextran, Chitosan oder Cyclodextrine) ermöglichten keine Diskriminierung zwischen Tumorzellen und Leukozyten, so dass die Art der Dextran-Derivatisierung als Voraussetzung für die Zellspezifität anzusehen ist. Unter Plasmazusatz sank der Anteil der markierten Leukozyten stark ab, so dass die Zugabe von humanem Blutplasma in niedrigen Konzentrationen (max. 1%) empfehlenswert erscheint. Die Inkubation von Tumorzellen mit Nanopartikeln führt vermutlich nicht zum erhöhten Zelluntergang, was in weiterführenden Untersuchungen überprüft werden sollte. Schlussendlich bedarf es noch weiterer Erklärungen, ob und wann die zirkulierenden Tumorzellen für die Ausbildung einer Metastase verantwortlich sind. Auch sollten Aufwand/Kosten und Nutzen der magnetbasierten Tumorzelldepletion in einem angemessenen Verhältnis stehen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aiken NR, Gillies RJ. 1996. Phosphomonoester metabolism as a function of cell proliferative status and exogenous precursors. *Anticancer Res*, May-Jun;16(3B):1393-7.
- Alexiou C, Jurgons R, Seliger C, Iro H. 2006. Medical applications of magnetic nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*, 6(9-10): 2762-8.
- Berry CC, Charles S, Wells S, Dalby MJ, Curtis AS. 2004. The influence of transferrin stabilised magnetic nanoparticles on human dermal fibroblasts in culture. *Int J Pharm*, Jan 9;269(1):211-25.
- Berry CC, Wells S, Charles S, Aitchison G, Curtis AS. 2004a. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials*, Oct;25(23):5405-13.
- Berry CC, Wells S, Charles S, Curtis AS. 2003. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, Nov;24(25):4551-7.
- Berry CC. 2004b. Possible exploitation of magnetic nanoparticle- cell interaction for biomedical applications. *J Mater Chem*, Oct;15:543-547.
- Bonnemain B. 1998. Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. Review. *J Drug Target*, 6(3):167-74.
- Bornmann S. 2008. Optimierung und Charakterisierung der Separation humaner Zellen mittels magnetischer Nanopartikel [Diplomarbeit]. Jena: Fachhochschule Jena-University of Applied Sciences, FB Medizintechnik und Biotechnologie.
- Braun S, Pantel K. 2000. Diagnosis and clinical significance of disseminated tumor cells in bone marrow. *Dtsch Med Wochenschr*, Oct 13;125(41):1237-9. Review.

- Brewster ME, Loftsson T. 2007. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev* 59, Nr. 7 645-666.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. Review. *Adv Drug Deliv Rev*, Sep 13;54(5):631-51.
- Brooks SC, Locke ER, Soule HD. 1973. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem*, Sep 10;248(17):6251-3.
- Butler TP, Gullino PM. 1975. Quantification of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res*, 35 (1975), 512-516.
- Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, Kroll T, Runnebaum I, Höffken K, Pachmann K. 2008. Monitoring the Response of Circulating Epithelial Tumor Cells (CETC) to Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Allows Detection of Patients at Risk of Early Relapse. *J Clin Oncol*, 26 (8): 1208-1215.
- Camara O, Kavallaris A, Noschel H, Rengsberger M, Jorke C, Pachmann K. 2006. Seeding of epithelial cells into circulation during surgery for breast cancer: the fate of malignant and benign mobilized cells. *World J Surg Oncol*, 4: 67.
- Chang YP, Pinaud F, Antelman J, Weiss S. 2008. Tracking bio-molecules in live cells using quantum dots. Review. *J Biophotonics*, Sep;1(4):287-98.
- Chouly C, Pouliquen D, Lucet I, Jeune JJ, Jallet P. 1996. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J Microencapsul*, May-Jun;13(3):245-55.
- Clement JH, Schwalbe M, Buske N, Wagner K, Schnabelrauch M, Görnert P, Kliche KO, Pachmann K, Weitschies W, Höffken K. 2006. Differential interaction of magnetic nanoparticles with tumor cells and peripheral blood cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, May;132(5):287-92.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LWMM, Hayes DF. 2004. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 351: 781–791.

- Davis SS. 1997. Biomedical applications of nanotechnology- implications for drug targeting and gene therapy. Review. Trends Biotechnol, Jun;15(6):217-24.
- Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G. 1996. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. J Natl Cancer Inst, Nov 20;88(22):1652-8.
- Dobson J. 2006. Magnetic micro- and nano-particle-based targeting for drug and gene delivery. Review. Nanomedicine (Lond), Jun;1(1):31-7.
- El-Boubbou K, Gruden C, Huang X. 2007. Magnetic glyco-nanoparticles: a unique tool for rapid pathogen detection, decontamination, and strain differentiation. J Am Chem Soc, Nov 7;129(44):13392-3.
- Fernández-Urrusuno R, Fattal E, Féger J, Couvreur P, Thérond P. 1997. Evaluation of hepatic antioxidant systems after intravenous administration of polymeric nanoparticles. Biomaterials, Mar;18(6):511-7.
- Fidler IJ. 2002. The organ microenvironment and cancer metastasis. Differentiation, 70(9-10): 498-505.
- Flohr T, Hess G, Kolbe K, Gamm H, Nolte H, Stanislawski T, Huber C, Derigs HG. 2002. Rituximab in vivo purging is safe and effective in combination with CD34-positive selected autologous stem cell transplantation for salvage therapy in B-NHL. Bone Marrow Transplant, May;29(9):769-75.
- Fortina P, Kricka LJ, Graves DJ, Park J, Hyslop T, Tam F, Halas N, Surrey S, Waldman SA. 2007. Applications of nanoparticles to diagnostics and therapeutics in colorectal cancer. Review. Trends Biotechnol, Apr;25(4):145-52.
- Fortin-Ripoche JP, Martina MS, Gazeau F, Ménager C, Wilhelm C, Bacri JC, Lesieur S, Clément O. 2006. Magnetic targeting of magnetoliposomes to solid tumors with MR imaging monitoring in mice: feasibility. Radiology, May;239(2):415-24.
- Fussell GW, Cooper SL. 2004. Synthesis and characterization of acrylic terpolymers with RGD peptides for biomedical applications. Biomaterials, Jul;25(15):2971-2978.

- Glöckl G, Weitschies W. 2007. Nanopartikelbasierte Kontrastmittel. *Der Onkologe*, 13:931-938.
- Göttlinger C, Radbruch A. 1993. Methoden der Zelltrennung. *mta* 8, 530-536.
- Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. 1994. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*, Mar 18;263(5153):1600-3.
- Gröger M, Kretzer EK, Woyke A. 2001. Reader „Cyclodextrine“. Science Forum an der Universität Siegen, Didaktik der Chemie.
- Gupta AK, Gupta M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18): 3995-4021.
- Hadjipanayis CG, Bonder MJ, Balakrishnan S, Wang X, Mao H, Hadjipanayis GC. 2008. Metallic iron nanoparticles for MRI contrast enhancement and local hyperthermia. *Small*. Nov;4(11):1925-9.
- Hersel U, Dahmen C, Kessler H. 2003. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. Review. *Biomaterials*, Nov;24(24):4385-415.
- Hu J, Li LS, Yang W, Manna L, Wang LW, Alivisatos AP. 2001. Linearly polarized emission from colloidal semiconductor quantum rods. *Science*, Jun 15;292(5524):2060-3.
- Johannsen M, Gneveckow U, Eckelt L, Feussner A, Waldöfner N, Scholz R, Deger S, Wust P, Loening SA, Jordan A. 2005. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique. *Int J Hyperthermia*, Nov;21(7):637-47.
- Jordan A, Maier-Hauff K, Wust P, Rau B, Johannsen M. 2007. Thermotherapie mit magnetischen Nanopartikeln. *Der Onkologe*, 13:894-902.
- Jordan A, Scholz R, Wust P, Fahling H, Felix R. 1999. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *J Magn Magn Mater*, 201:413-419.

- Katz E, Willner I. 2004. Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: applications in nanobioelectronics. Review. *Chemphyschem*, Aug 20;5(8):1084-104.
- Kawashima Y. 2001. Nanoparticulate systems for improved drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, Mar 23;47(1):1-2.
- Klein S, Zöller T. 2008. Molekulare Zuckertüten für Arzneistoffe. *PZ Pharmazeutische Zeitung online*, 26/2008.
- Klostranec JM, Chan WCW. 2006. Quantum dots in biological and biomedical research: recent progress and present challenges. *Adv Mater*, 18:1953-1964.
- Labhasetwar V, Leslie-Pelecky DL. 2007. *Biomedical Applications of Nanotechnologie*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Lacava LM, Lacava ZG, Da Silva MF, Silva O, Chaves SB, Azevedo RB, Pelegrini F, Gansau C, Buske N, Sabolovic D, Morais PC. 2001. Magnetic resonance of a dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. *Biophys J*, May;80(5):2483-6.
- Liberti PA, Rao CG, Terstappen L. 2001. Optimization of ferrofluids and protocols for enrichment of breast tumor cells in blood. *J Magn Magn Mater*, 225:301-307.
- Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. 1974. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 31, 997-1004.
- Liu R, Liew R, Zhou J, Xing B. 2007. A simple and specific assay for real-time colorimetric visualization of beta-lactamase activity by using gold nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46(46):8799-803. Erratum in: *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008;47(17):3081.
- Lobodasch K, Frohlich F, Rengsberger M, Schubert R, Dengler R, Pachmann U, Pachmann K. 2007. Quantification of circulating tumour cells for the monitoring of adjuvant therapy in breast cancer: an increase in cell number at completion of therapy is a predictor of early relapse. *Breast*, 16(2): 211-8.
- Lu FS, Gu LR, Meziani MJ, Wang X, Luo PG, Veca LM, Cao L, Sun YP. 2009. Advances in bioapplications of carbon nanotubes. *Adv Mater*, 21:139-152.

- Lundberg P, Langel U. 2003. A brief introduction to cell-penetrating peptides. Review. *J Mol Recognit*, Sep-Oct;16(5):227-33.
- Martin VM, Siewert C, Scharl A, Harms T, Heinze R, Ohl S, Radbruch A, Miltenyi S, Schmitz J. 1998. Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp Hematol*, Mar;26(3):252-64.
- Mayhew E, Glaves D. 1984. Quantitation of tumorigenic disseminating and arrested cancer cells. *Br J Cancer*, Aug;50(2):159-66.
- Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11(2): 231-8.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. 2001. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. Review. *Pharmacol Rev*, Jun;53(2):283-318.
- Molday RS, MacKenzie D. 1982. Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. *J Immunol Methods*, Aug 13;52(3):353-67.
- Moore A, Marecos E, Bogdanov A Jr, Weissleder R. 2002. Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model. *Radiology*, Feb;214(2):568-74.
- Moore A, Weissleder R, Bogdanov A Jr. 1997. Uptake of dextran-coated monocrystalline iron oxides in tumor cells and macrophages. *J Magn Reson Imaging*, Nov-Dec;7(6):1140-5.
- Moreno JG, Croce CM, Fischer R, Monne M, Vihko P, Mulholland SG, Gomella LG. 1992. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res*, Nov 1;52(21):6110-2.
- Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PH, Dinsdale D, Smith T, Xu H, Vermynen J, Nemery B. 2002. Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model. *Am J Respir Crit Care Med*, Oct 1;166(7):998-1004.
- Nirmal M, Brus L. 1999. Luminescence photophysics in semiconductor nanocrystals. *Acc Chem Res*, 32:407-414.

- Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, Kroll T, Jorke C, Hammer U, Altendorf-Hofmann A, Rabenstein C, Pachmann U, Runnebaum I, Hoffken K. 2008a. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *Journal of Clinical Oncology*, 26(8): 1208-1215.
- Pachmann K, Dengler R, Lobodasch K, Frohlich F, Kroll T, Rengsberger M, Schubert R, Pachmann U. 2008b. An increase in cell number at completion of therapy may develop as an indicator of early relapse: quantification of circulating epithelial tumor cells (CETC) for monitoring of adjuvant therapy in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 134(1): 59-65.
- Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D: Appl Phys*, 36 R167.
- Plank C, Scherer F, Alexiou C, Trahms L. 2007. Nanomagnetomedizin. *Der Onkologe*, 13:903-916.
- Polyak B, Friedman G. 2009. Magnetic targeting for site-specific drug delivery: applications and clinical potential. Review. *Expert Opin Drug Deliv*, Jan;6(1):53-70.
- Portet D, Denizot B, Rump E, Lejeune JJ, Jallet P. 2001. Nonpolymeric Coatings of Iron Oxide Colloids for Biological Use as Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *J Colloid Interface Sci*, Jun 1;238(1):37-42.
- Raynal I, Prigent P, Peyramaure S, Najid A, Rebuzzi C, Corot C. 2004. Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10. *Invest Radiol*, Jan;39(1):56-63.
- Reuter P, Hrsg. 2004. Springer Lexikon Medizin. Berlin, Heidelberg, New York: Springer- Verlag.
- Robert-Koch-Institut, Hrsg und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., Hrsg. 2008. Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 6te überarbeitete Auflage. Berlin.

- Ryser HJ. 1967. Studies on protein uptake by isolated tumor cells. 3. Apparent stimulations due to pH, hypertonicity, polycations or dehydration and their relation to the enhanced penetration of infectious nucleic acids. *J Cell Biol*, Mar;32(3):737-50.
- Sasaki T, Iwasaki N, Kohno K, Kishimoto M, Majima T, Nishimura S, Minami A. 2008. Magnetic nanoparticles for improving cell invasion in tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, Sep 15;86(4):969-78.
- Schafer DA. 2002. Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. Review. *Curr Opin Cell Biol*, Feb;14(1):76-81.
- Schnabelrauch M, Clement JH. 2007. Design von bioaktiven und nanostrukturierten Oberflächen. *Der Onkologe*, 13:917-930.
- Schwalbe M, Buske N, Vetterlein M, Höffken K, Pachmann K, Clement JH. 2006a. The Carboxymethyl Dextran Shell is an Important Modulator of Magnetic Nanoparticle Uptake in Human Cells. *Z Phys Chem*, 220:125-131.
- Schwalbe M, Jörke C, Buske N, Höffken K, Pachmann K, Clement JH. 2005. Selective reduction of the interaction of magnetic nanoparticles with leukocytes and tumor cells by human plasma. *J Magn Magn Mater*, 293:433-437.
- Schwalbe M, Pachmann K, Höffken K, Clement JH. 2006b. Improvement of the separation of tumor cells from peripheral blood cells using magnetic nanoparticles. *J Phys-Condens Mat*, 18:2865-2876.
- Semple JW, Allen D, Chang W, Castaldi P, Freedman J. 1993. Rapid separation of CD4+ and CD19+ lymphocyte populations from human peripheral blood by a magnetic activated cell sorter (MACS). *Cytometry*, Nov;14(8):955-60.
- Shen TT, Bogdanov A Jr, Bogdanova A, Poss K, Brady TJ, Weissleder R. 1996. Magnetically labeled secretin retains receptor affinity to pancreas acinar cells. *Bioconjug Chem*, May-Jun;7(3):311-6.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, Nov; 51(5):1409-16.

- Sperling RA, Rivera Gil P, Zhang F, Zanella M, Parak WJ. 2008. Biological applications of gold nanoparticles. Review. Chem Soc Rev, Sep;37(9):1896-1908.
- Vlems FA, Ruers TJ, Punt CJ, Wobbes T, van Muijen GN. 2003. Relevance of disseminated tumour cells in blood and bone marrow of patients with solid epithelial tumours in perspective. Eur J Surg Oncol, 29(4):289-302.
- Wagner K, Kautz A, Röder M, Schwalbe M, Pachmann K, Clement JH, Schnabelrauch M. 2004. Synthesis of oligonucleotide-functionalized magnetic nanoparticles and study on their in vitro cell uptake. Appl Organomet Chem, 18:514-519.
- Weiss L. Metastatic inefficiency. In Liotta, LA, Hart IR. 1982b. Tumor Invasion and Metastasis. Nijhoff, The Hague, 81-98.
- Wickline SA, Lanza GM. 2003. Nanotechnology for molecular imaging and targeted therapy. Circulation, Mar 4;107(8):1092-5.
- Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons JN, Bacri JC, Gazeau F. 2003. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. Biomaterials, Mar;24(6):1001-11.
- Wilmanns W, Huhn D, Wilms K, Hrsg. 2000. Internistische Onkologie. zweite Aufl. Stuttgart, New York: Thieme- Verlag.
- Wilson R. 2008. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. Chem Soc Rev, Sep;37(9):2028-45.
- Wong LS, Bateman WJ, Morris AG, Fraser IA. 1995. Detection of circulating tumour cells with the magnetic activated cell sorter. Br J Surg, Oct;82(10):1333-7.
- Wotschadlo J, Liebert T, Heinze T, Wagner K, Schnabelrauch M, Dutz S, Müller R, Steiniger F, Schwalbe M, Kroll TC, Höffken K, Buske N, Clement JH. 2009. Magnetic nanoparticles coated with tailored polysaccharide-based shells – Interaction with human cells. J Magn Magn Mater, 321: 1469-1473.

Wotschadlo J. 2006. Serumabhängigkeit der endozytotischen Aktivität von Tumorzellen [Diplomarbeit]. Jena: Fachhochschule Jena-University of Applied Sciences, FB Medizintechnik und Biotechnologie.

Internetquellen der FACS-Abbildungen:

<http://www.med-serv.de/ma-2832-facs.html>

http://www.antikoerper-online.de/images/news/resources_FACS_1_de.jpg

www.rrk-berlin.de/nephrologie/pics/durch3.png Charité Universitätsmedizin Berlin,
gemeinsame Einrichtung von Freier Universität und Humboldt-Universität zu
Berlin, Campus Buch;

www.facslab.unibe.ch/apop.html

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Modell eines magnetischen Nanopartikels aus Schwalbe M, Buske N, Vetterlein M, Höffken K, Pachmann K, Clement JH. 2006a. The Carboxymethyl Dextran Shell is an Important Modulator of Magnetic Nanoparticle Uptake in Human Cells. Z. Phys. Chem. 220: 125-131.....	20
Abbildung 2: Kulturzellen MCF7 (Brustkrebszelllinie) mit intrazellulär aufgenommenen Polystyrol-Nanopartikeln (100 nm im Durchmesser, fluoreszenzgekoppelt) mit freundlicher Genehmigung von Christiane Rickmann.....	21
Abbildung 3: Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus der Cyclodextrine aus Gröger M, Kretzer EK, Woyke A. Reader „Cyclodextrine“. 2001. Science Forum an der Universität Siegen, Didaktik der Chemie.	24
Abbildung 4: modifiziert aus Göttliger C und Radbruch A. 1993. Methoden der Zelltrennung. mta 8, 530-536.	26
Abbildung 5: SuperMACS™ II Separator aus Column_Decision_Flyer Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach.....	27
Abbildung 6 links: Charakterisierung von ungefärbten Zellen anhand der Lichtstreuung (Dot Plot). Große Zellen befinden sich rechts in der Abbildung. Granuläre Zellen befinden sich oben. Granulozyten (große Zellen mit hoher Granularität) werden demnach rechts oben angezeigt. aus http://www.antikoerperonline.de/images/news/resources_FACS_1_de.jpg	28
Abbildung 7 rechts: FACS-Darstellung der Leukozytenpopulationen, Charité Universitätsmedizin Berlin, gemeinsame Einrichtung von Freier Universität und Humboldt-Universität zu Berlin, Campus Buch; www.rrk-berlin.de/nephrologie/pics/durch3.png	28
Abbildung 8: die orange-fluoreszierenden CD 45-positiven Zellen (Leukozyten) sind gut von den EpCAM-positiven Zellen mit kappenförmiger grüner Fluoreszenzmarkierung (Tumorzellen) zu unterscheiden; links in 250-facher, rechts in 500-facher Vergrößerung	30

Abbildung 9: Vergleich der Interaktionskinetiken von Tumorzellen (MCF7) und Leukozyten mit verschiedenen umhüllten magnetischen Nanopartikeln, Diagramme zeigen die absolute Zahl an Zellen in der Positiv- und Negativfraktion ohne Bezug auf die Ausgangszellzahl in Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Einzelkinetiken, C Carboxy-, CM Carboxymethyl-	33
Abbildung 10: Histogramme der Leerproben (A, B) veranschaulichen das Auftreten der Zellen in unterschiedlichen Fluoreszenzbereichen; daneben das Beispiel einer Positivfraktion (C) mit abgereicherten Leukozyten und angereicherten Tumorzellen (MCF7)	36
Abbildung 11: Dextran-Partikel, Graphiken zeigen die Ergebnisse aus 3 Einzelkinetiken Heparinblut mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung, kein Plasmazusatz, PF Positivfraktion, NF Negativfraktion.....	37
Abbildung 12: Carboxy-Dextran-Partikel, Graphiken zeigen die Ergebnisse aus 3 Einzelkinetiken Heparinblut mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung, kein Plasmazusatz, PF Positivfraktion, NF Negativfraktion.....	38
Abbildung 13: Carboxymethyl-Dextran-Partikel, Graphiken zeigen die Ergebnisse aus 3 Einzelkinetiken Heparinblut mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung, kein Plasmazusatz, PF Positivfraktion, NF Negativfraktion.....	39
Abbildung 14: Carboxymethyl-Cellulose-Partikel, Graphiken zeigen die Ergebnisse aus 3 Einzelkinetiken Heparinblut mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung, kein Plasmazusatz, PF Positivfraktion, NF Negativfraktion.....	40
Abbildung 15: (Dextran) zeigt Mittelwerte der Tumorzellanteile (links) und Leukozytenanteile (rechts) der Positivfraktion im Zeitverlauf aus 2 Einzelversuchen mit Plasmazusatz, Zahlenwerte sind dabei bezogen auf die Gesamtzahl der eingesetzten Tumorzellen bzw. Leukozyten	42
Abbildung 16: (Carboxy-Dextran) zeigt Mittelwerte der Tumorzellanteile (links) und Leukozytenanteile (rechts) der Positivfraktion im Zeitverlauf aus 2 Einzelversuchen mit Plasmazusatz, Zahlenwerte sind dabei bezogen auf die Gesamtzahl der eingesetzten Tumorzellen bzw. Leukozyten	42

Abbildung 17: (Carboxymethyl-Dextran) zeigt Mittelwerte der Tumorzellanteile (links) und Leukozytenanteile (rechts) der Positivfraktion im Zeitverlauf aus 2 Einzelversuchen mit Plasmazusatz, Zahlenwerte sind dabei bezogen auf die Gesamtzahl der eingesetzten Tumorzellen bzw. Leukozyten	44
Abbildung 18: (Carboxymethyl-Cellulose) zeigt Mittelwerte der Tumorzellanteile (links) und Leukozytenanteile (rechts) der Positivfraktion im Zeitverlauf aus 2 Einzelversuchen mit Plasmazusatz, Zahlenwerte sind dabei bezogen auf die Gesamtzahl der eingesetzten Tumorzellen bzw. Leukozyten	44
Abbildung 19: Vergleich der Interaktionskinetiken von Tumorzellen (MCF7) und Leukozyten mit verschiedenen umhüllten magnetischen Nanopartikeln, Diagramme zeigen die absolute Zahl an Zellen in der Positiv- und Negativfraktion ohne Bezug auf die Ausgangszellzahl in Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Einzelkinetiken, CM Carboxymethyl-.....	46
Abbildung 20: (A) erklärende Darstellung einer Zellpopulation im Apoptosetest als Dot Plot aus www.facslab.unibe.ch/apop.html ; (B) MCF7 ohne Nanopartikelzugabe am 2. Inkubationstag; (C) Beispiel einer Positivfraktion am 2. Inkubationstag mit Anstieg der nekrotischen Zellen im oberen rechten Quadranten	47
Abbildung 21: Anteile der apoptotischen und nekrotischen Tumorzellen (MCF7) im Verlauf der Langzeitinkubation A und B	48
Abbildung 22: „Fahrplan“ der <i>ex vivo</i> Experimente modifiziert nach Schwalbe M et al. 2006. Magnetic tumor cell depletion from peripheral blood. [Poster].	53
Abbildung 23: (A) Markierung (R1-3) aller Leukozytensubpopulationen für die weitere Analyse; (B) Beispiel einer Negativfraktion; (C) Beispiel einer Positivfraktion mit angereicherten EpCAM-positiven Zellen im rechten oberen Quadranten	53
Abbildung 24: Tumorzellanreicherung in den Positivfraktionen (PF) gegenüber den Negativfraktionen (NF) der Patientenproben im Vergleich aller eigenumhüllten Nanopartikel, C Carboxy-, CM Carboxymethyl-	54
Abbildung 25: Gegenüberstellung der möglichen Tumorzellanreicherung (links) sowie der allgemeinen Partikelaufnahme in Blutzellen (Leukozyten und Tumorzellen,	

rechts) im Vergleich der eigenumhüllten Nanopartikel, Dex Dextran, C-Dex Carboxy-Dextran, CM-Dex Carboxymethyl-Dextran, CM-Cellu Carboxymethyl-Cellulose, PF Positivfraktion, NF Negativfraktion	55
Abbildung 26: Tumorzellanreicherung in den Positivfraktionen (PF) gegenüber den Negativfraktionen (NF) der Patientenproben im Vergleich aller Innovent-Nanopartikel, C Carboxy-, CM Carboxymethyl-, Cyclo Cyclodextrin.....	56
Abbildung 27: Gegenüberstellung der möglichen Tumorzellanreicherung (links) sowie der allgemeinen Partikelaufnahme in Blutzellen (Leukozyten und Tumorzellen, rechts) im Vergleich der Innovent-Nanopartikel, CM Carboxymethyl-, PF Positivfraktion, NF Negativfraktion	57
Abbildung 28: Modell “Magnetic tumor cell depletion from peripheral blood” von Schwalbe M, Jörke C, Wagner K, Pachmann K, Buske N, Schnabelrauch M, Höffken K, Clement JH [Poster], 2006	60

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: verwendete Geräte und Hilfsmittel	16
Tabelle 2: verwendete Chemikalien und Nährmedien	17
Tabelle 3: verwendete Materialien zur Umhüllung von Nanopartikeln	17
Tabelle 4: verwendete Nanopartikel von Innovent e.V.	17
Tabelle 5: verwendete Nanopartikel von Innovent e.V.	23
Tabelle 6: Stoffeigenschaften der natürlichen Cyclodextrine (CD) aus Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. 2007. Adv. Drug Deliv. Rev. 59, Nr. 7 645-666.....	25
Tabelle 7: Absorptions- und Emissionsmaxima einiger Fluorochrome	29
Tabelle 8: Übersicht über Versuchsansätze und die Anzahl der Durchführungen....	36
Tabelle 9: maximal mögliche Tumorzellanreicherung (%) in der Positivfraktion in Abhängigkeit von der Inkubationszeit im Partikelvergleich; (entspr.) bedeutet den daraus berechneten Anreicherungsfaktor bei eingesetzten 5 % Tumorzellen ...	41
Tabelle 10: maximal mögliche Tumorzellanreicherung (%) in der Positivfraktion ohne und mit Zusatz von 2,5 % humanem Blutplasma im Partikelvergleich	44

ANHANG

zu 2.5.1. Magnetische Markierung und Sortierung - Aufnahme einer Kinetik

Bsp. der rechnerischen Auswertung einer Einzelkinetik, Tumorzellen und Leukozyten

MCF7 (1000000 Zellen pro Ansatz+2,5µl NP)

Zeit	Negativ-fraktion [Zellen]	Negativ-fraktion [%]	Positiv-fraktion [Zellen]	Positiv-fraktion [%]	Gesamt-summe [Zellen]	Verlust [Zellen]	Verlust [%]
0	567600	85%	96800	15%	664400	335600	34%
4	471200	68%	222400	32%	693600	306400	31%
8	413200	63%	246800	37%	660000	340000	34%
12	404000	57%	309600	43%	713600	286400	29%
16	399600	56%	311600	44%	711200	288800	29%

Leukozyten (2500000 Zellen pro Ansatz+2,5µl NP)

Zeit	Negativ-fraktion [Zellen]	Negativ-fraktion [%]	Positiv-fraktion [Zellen]	Positiv-fraktion [%]	Gesamt-summe [Zellen]	Verlust [Zellen]	Verlust [%]
0	1647000	94%	111200	6%	1758200	741800	30%
4	1337000	84%	263600	16%	1600600	899400	36%
8	1201000	74%	427200	26%	1628200	871800	35%
12	742400	57%	567200	43%	1309600	1190400	48%
16	694800	51%	660800	49%	1355600	1144400	46%
20	588000	46%	697200	54%	1285200	1214800	49%

zu 2.7. Laser Scanning Cytometrie (LSC)

Protokoll zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen:

Erythrozytenlyse: - 1 ml Blut auf 9 ml Erythrozytenlyse-Puffer (Qiagen) geben
- 10 min bei Raumtemperatur lysieren
- 10 min bei 1200 U/min zentrifugieren und Überstand verwerfen

Antikörperzugabe: - Pellet in 500 µl PE-Puffer resuspendieren
- davon 100 µl in Eppendorf Tube pipettieren
- 2,5 µl EpCAM (Anti-HEA) und 1,0 µl CD 45-PE hinzufügen
- schwenken und 15 min im Kühlschrank inkubieren
- Probe mit 896 µl PE-Puffer auffüllen und mischen
- 100 µl der Zellsuspension und 80 µl PE auf Objektträger geben
- am LSC messen

zu 3.1. Berechnungen zum Einsatz der eigenumhüllten Nanopartikel an reinen Tumorzell- und Leukozytenkulturen

Dextran- Ergebnisse aus jeweils 3 Einzelkinetiken

MCF7

Zeit	Mittelwert Negativ- fraktion [%]	STABW Negativ- fraktion	Mittelwert Positiv- fraktion [%]	STABW Positiv- fraktion
0	79%	0,10	21%	0,10
4	44%	0,30	56%	0,30
8	41%	0,25	59%	0,25
12	39%	0,25	61%	0,25
16	40%	0,27	60%	0,27

Leukozyten

Zeit	Mittelwert Negativ- fraktion [%]	STABW Negativ- fraktion	Mittelwert Positiv- fraktion [%]	STABW Positiv- fraktion
0	94%	0,01	6%	0,01
4	83%	0,06	17%	0,06
8	72%	0,04	28%	0,04
12	57%	0,09	43%	0,09
16	48%	0,03	52%	0,03
20	41%	0,05	59%	0,05

Carboxy-Dextran- Ergebnisse aus jeweils 3 Einzelkinetiken

MCF7

Zeit	Mittelwert Negativ- fraktion [%]	STABW Negativ- fraktion	Mittelwert Positiv- fraktion [%]	STABW Positiv- fraktion
0	80%	0,04	20%	0,04
4	49%	0,35	51%	0,35
8	50%	0,35	50%	0,35
12	52%	0,36	48%	0,36
16	52%	0,37	48%	0,37

Leukozyten

Zeit	Mittelwert Negativ- fraktion [%]	STABW Negativ- fraktion	Mittelwert Positiv- fraktion [%]	STABW Positiv- fraktion
0	94%	0,01	6%	0,01
4	85%	0,07	15%	0,07
8	83%	0,05	17%	0,05
12	75%	0,12	25%	0,12
16	72%	0,10	28%	0,10
20	63%	0,13	37%	0,13

Carboxymethyl-Dextran- Ergebnisse aus jeweils 3 Einzelkinetiken

MCF7

Zeit	Mittelwert Negativ- fraktion [%]	STABW Negativ- fraktion	Mittelwert Positiv- fraktion [%]	STABW Positiv- fraktion
0	58%	0,09	42%	0,09
4	42%	0,18	58%	0,18
8	39%	0,22	61%	0,22
12	30%	0,19	70%	0,19
16	30%	0,24	70%	0,24

Leukozyten

Zeit	Mittelwert Negativ- fraktion [%]	STABW Negativ- fraktion	Mittelwert Positiv- fraktion [%]	STABW Positiv- fraktion
0	95%	0,01	5%	0,01
4	88%	0,02	12%	0,02
8	79%	0,08	21%	0,08
12	76%	0,03	24%	0,03
16	70%	0,08	30%	0,08
20	66%	0,08	34%	0,08

Carboxymethyl-Cellulose- Ergebnisse aus jeweils 3 Einzelkinetiken

MCF7

Zeit	Mittelwert Negativ- fraktion [%]	STABW Negativ- fraktion	Mittelwert Positiv- fraktion [%]	STABW Positiv- fraktion
0	67%	0,17	33%	0,17
4	51%	0,17	49%	0,17
8	50%	0,22	50%	0,22
12	43%	0,24	57%	0,24
16	39%	0,23	61%	0,23

Leukozyten

Zeit	Mittelwert Negativ- fraktion [%]	STABW Negativ- fraktion	Mittelwert Positiv- fraktion [%]	STABW Positiv- fraktion
0	93%	0,03	7%	0,03
4	87%	0,09	13%	0,09
8	82%	0,13	18%	0,13
12	74%	0,21	26%	0,21
16	70%	0,23	30%	0,23
20	71%	0,28	29%	0,28

zu 3.2.1. Berechnungen zur Tumorzellanreicherung der verschiedenen Nanopartikel

DEXTRAN

Zeit	PF	PF	PF	NF	NF
	MW MCF7	STABW MCF7	An- reicherung MCF7	MW Leukozyten	STABW Leukozyten
[min]	[%]	[%]	Faktor	[%]	[%]
0	21,34%	6,24%	4,27	97,84%	1,21%
4	10,71%	5,03%	2,14	97,40%	2,87%
8	8,58%	2,34%	1,72	96,82%	3,80%
12	7,41%	1,65%	1,48	97,29%	2,69%
16	7,03%	0,90%	1,41	97,83%	1,78%
20	6,63%	0,56%	1,33	97,86%	2,17%

CARBOXY-DEXTRAN

Zeit	PF	PF	PF	NF	NF
	MW MCF7	STABW MCF7	An- reicherung MCF7	MW Leukozyten	STABW Leukozyten
[min]	[%]	[%]	Faktor	[%]	[%]
0	14,35%	8,00%	2,87	96,45%	0,72%
4	14,00%	7,35%	2,80	97,81%	0,86%
8	10,12%	4,77%	2,02	97,84%	1,24%
12	8,91%	4,17%	1,78	97,92%	1,45%
16	8,71%	3,80%	1,74	97,49%	1,97%
20	6,13%	4,00%	1,23	97,83%	1,79%

CARBOXYMETHYL-DEXTRAN

Zeit	PF	PF	PF	NF	NF
	MW MCF7	STABW MCF7	An- reicherung MCF7	MW Leukozyten	STABW Leukozyten
[min]	[%]	[%]	Faktor	[%]	[%]
0	20,15%	5,67%	4,03	95,57%	1,84%
4	15,26%	4,26%	3,05	95,80%	2,82%
8	10,21%	2,47%	2,04	96,31%	2,69%
12	7,55%	2,95%	1,51	96,00%	2,59%
16	7,19%	1,96%	1,44	95,49%	3,19%
20	7,34%	1,62%	1,47	95,51%	3,01%

CARBOXYMETHYL-CELLULOSE

Zeit	PF	PF	PF	NF	NF
	MW MCF7	STABW MCF7	An- reicherung MCF7	MW Leukozyten	STABW Leukozyten
[min]	[%]	[%]	Faktor	[%]	[%]
0	19,14%	10,08%	3,83	96,01%	1,90%
4	16,08%	9,11%	3,22	96,98%	2,40%
8	8,52%	3,07%	1,7	96,96%	2,25%
12	7,18%	2,61%	1,44	96,04%	2,70%
16	6,67%	2,59%	1,33	95,39%	3,28%
20	6,46%	2,26%	1,29	95,62%	3,12%

zu 3.2.2. Berechnungen zum Einfluss von humanem Plasma auf die Tumorzell-anreicherung

DEXTRAN

Zeit	PF	PF	PF	NF	NF
	MW MCF7	STABW MCF7	An- reicherung MCF7	MW Leukozyten	STABW Leukozyten
[min]	[%]	[%]	Faktor	[%]	[%]
0	11,84%	7,04%	2,37	95,00%	2,09%
4	16,13%	1,27%	3,23	96,26%	1,03%
8	8,69%	2,60%	1,74	95,77%	1,38%
12	11,25%	0,91%	2,25	96,30%	0,93%
16	9,13%	1,37%	1,83	96,50%	0,74%
20	10,63%	1,29%	2,13	96,23%	0,55%

CARBOXY-DEXTRAN

Zeit	PF	PF	PF	NF	NF
	MW MCF7	STABW MCF7	An- reicherung MCF7	MW Leukozyten	STABW Leukozyten
[min]	[%]	[%]	Faktor	[%]	[%]
0	12,81%	3,80%	2,56	95,27%	1,29%
4	13,26%	0,81%	2,65	96,44%	0,33%
8	13,17%	0,32%	2,63	96,50%	0,01%
12	12,35%	3,29%	2,47	96,66%	0,68%
16	12,05%	2,74%	2,41	96,80%	0,44%
20	13,20%	2,72%	2,64	96,51%	0,33%

CARBOXYMETHYL-DEXTRAN

Zeit	PF	PF	PF	NF	NF
	MW MCF7	STABW MCF7	An- reicherung MCF7	MW Leukozyten	STABW Leukozyten
[min]	[%]	[%]	Faktor	[%]	[%]
0	11,93%	7,56%	2,39	95,98%	1,43%
4	14,46%	5,12%	2,89	96,78%	0,98%
8	11,39%	4,29%	2,28	96,54%	1,27%
12	9,79%	2,18%	1,96	96,34%	0,88%
16	11,01%	1,87%	2,20	96,66%	1,42%
20	8,79%	1,07%	1,76	96,64%	1,22%

CARBOXYMETHYL-CELLULOSE

Zeit	PF	PF	PF	NF	NF
	MW MCF7	STABW MCF7	An- reicherung MCF7	MW Leukozyten	STABW Leukozyten
[min]	[%]	[%]	Faktor	[%]	[%]
0	12,33%	4,07%	2,47	96,76%	0,68%
4	11,23%	5,71%	2,25	97,24%	1,29%
8	12,80%	1,78%	2,56	97,63%	0,72%
12	10,26%	0,42%	2,05	97,39%	0,60%
16	8,58%	0,91%	1,72	97,08%	1,37%
20	9,82%	0,32%	1,96	97,57%	0,39%

zu 3.3. Berechnungen zum Einsatz der Innovent- Nanopartikel an reinen Tumorzell- und Leukozytenkulturen

V200 - Amino-Dextran, Ergebnisse aus jeweils 3 Einzelkinetiken

MCF7

Zeit	Mittelwert Negativ- fraktion [%]	STABW Negativ- fraktion	Mittelwert Positiv- fraktion [%]	STABW Positiv- fraktion
0	74%	0,05	26%	0,05
4	68%	0,10	32%	0,10
8	71%	0,06	29%	0,06
12	67%	0,07	33%	0,07
16	70%	0,04	30%	0,04

Leukozyten

Zeit	Mittelwert Negativ- fraktion [%]	STABW Negativ- fraktion	Mittelwert Positiv- fraktion [%]	STABW Positiv- fraktion
0	96%	0,01	4%	0,01
4	94%	0,02	6%	0,02
8	95%	0,01	5%	0,01
12	95%	0,01	5%	0,01
16	93%	0,02	7%	0,02
20	95%	0,02	5%	0,02

V207 - Carboxymethyl-Chitosan, Ergebnisse aus jeweils 3 Einzelkinetiken

MCF7

Zeit	Mittelwert Negativ- fraktion [%]	STABW Negativ- fraktion	Mittelwert Positiv- fraktion [%]	STABW Positiv- fraktion
0	74%	0,06	26%	0,06
4	79%	0,04	21%	0,04
8	71%	0,14	29%	0,14
12	74%	0,08	26%	0,08
16	72%	0,10	28%	0,10

Leukozyten

Zeit	Mittelwert Negativ- fraktion [%]	STABW Negativ- fraktion	Mittelwert Positiv- fraktion [%]	STABW Positiv- fraktion
0	58%	0,03	42%	0,03
4	64%	0,06	36%	0,06
8	60%	0,04	40%	0,04
12	54%	0,05	46%	0,05
16	55%	0,08	45%	0,08
20	50%	0,05	50%	0,05

V208/2 - Carboxymethyl- γ -Cyclodextrin, Ergebnisse aus jeweils 3 Einzelkinetiken

MCF7

Zeit	Mittelwert Negativ- fraktion [%]	STABW Negativ- fraktion	Mittelwert Positiv- fraktion [%]	STABW Positiv- fraktion
0	20%	0,12	80%	0,12
4	15%	0,01	85%	0,01
8	16%	0,07	84%	0,07
12	18%	0,07	82%	0,07
16	15%	0,08	85%	0,08

Leukozyten

Zeit	Mittelwert Negativ- fraktion [%]	STABW Negativ- fraktion	Mittelwert Positiv- fraktion [%]	STABW Positiv- fraktion
0	10%	0,01	90%	0,01
4	6%	0,03	94%	0,03
8	8%	0,00	92%	0,00
12	7%	0,03	93%	0,03
16	5%	0,01	95%	0,01
20	5%	0,00	95%	0,00

V209 - Carboxymethyl- β -Cyclodextrin, Ergebnisse aus jeweils 3 Einzelkinetiken

MCF7

Zeit	Mittelwert Negativ- fraktion [%]	STABW Negativ- fraktion	Mittelwert Positiv- fraktion [%]	STABW Positiv- fraktion
0	26%	0,05	74%	0,05
4	49%	0,13	51%	0,13
8	47%	0,19	53%	0,19
12	31%	0,16	69%	0,16
16	32%	0,09	68%	0,09

Leukozyten

Zeit	Mittelwert Negativ- fraktion [%]	STABW Negativ- fraktion	Mittelwert Positiv- fraktion [%]	STABW Positiv- fraktion
0	14%	0,03	86%	0,03
4	12%	0,02	88%	0,02
8	9%	0,02	91%	0,02
12	10%	0,04	90%	0,04
16	9%	0,01	91%	0,01
20	9%	0,03	91%	0,03

zu 3.4. Berechnungen zu Langzeiteffekten magnetischer Nanopartikel auf Tumorzellen

Inkubation A:

NP	TAG 1	TAG 2	TAG 4
	apoptotische Zellen [%]	apoptotische Zellen [%]	apoptotische Zellen [%]
CM-Dex	28,34	22,42	18,40
V 200	26,06	31,88	21,80
V 207	27,24	34,70	30,32
V 208/2	23,68	24,26	20,32
V 209	19,50	29,56	17,68

Inkubation B:

NP	TAG 1	TAG 2	TAG 4	TAG 7
	apoptotische Zellen [%]	apoptotische Zellen [%]	apoptotische Zellen [%]	apoptotische Zellen [%]
CM-Dex	17,80	21,72	11,24	
V 200	19,08	27,60		
V 207	19,74	24,08	12,62	
V 208/2	20,76	28,36	12,66	13,72
V 209	17,46	20,56	14,62	23,82

Mittelwerte und Standardabweichung:

	TAG 1		TAG 2		TAG 4	
NP	Mittelwert [%]	STABW [%]	Mittelwert [%]	STABW [%]	Mittelwert [%]	STABW [%]
CM-Dex	23,07	7,45	22,07	0,49	14,82	5,06
V 200	22,57	4,94	29,74	3,03		
V 207	23,49	5,30	29,39	7,51	21,47	12,52
V 208/2	22,22	2,06	26,31	2,90	16,49	5,42
V 209	18,48	1,44	25,06		16,15	2,16

zu 3.5. Abgleich der *in vitro* Daten mit Patientenblut

3.5.1. Berechnungen zum Einsatz der eigenumhüllten Partikel

		Total			PF	NF	PF	NF	PF	NF
Patient	Partikel	Tumorzellen im LSC gemessen pro ml Blut	Gesamtzell- zahl der Probe pro ml Blut	daraus errechneter Tumorzell- anteil (LSC basiert) [%]	PF Anzahl Zellen pro ml	NF Anzahl Zellen pro ml	Anteil Tumorzellen in Gesamtzell- zahl PF [%]	Anteil Tumorzellen in Gesamtzell- zahl NF [%]	Tumorzell- zahl in PF (aus FACS)	Tumorzell- zahl in NF (aus FACS)
Gey., D.	C-Dex	3800	2346750	0,16	546400	373200	0,8%	2,8%	45	103
Häd., W.	C-Dex	4000	3315000	0,12	317200	1175000	1,2%	0,0%	37	1
Kir., K.	C-Dex	1200	4410000	0,03	272800	1264000	0,3%	0,0%	9	1
Klo., D.	C-Dex	3800	3370000	0,11	130400	724400	0,5%	0,1%	6	5
Kre., R.	C-Dex	18000	2268000	0,79	442000	644000	1,2%	0,2%	52	12
Rie., E.	C-Dex	10944	2342000	0,47	716400	173200	1,5%	0,7%	110	12
Schw., R.	C-Dex	4800	2640000	0,18	737600	160000	1,3%	1,5%	94	24
Mittelwert	C-Dex	6649			451829	644829	1,0%	0,4%	51	23
STABW		5826			228836	447598	0,5%	0,6%	39	36
<i>t- Test mit Gey.</i>										0,20
<i>t- Test o. Gey.</i>										0,04
Gey., D.	CM-Cellu	3800	2346750	0,16	410000	587200	1,6%	6,5%	64	379
Häd., W.	CM-Cellu	4000	3315000	0,12	242000	974800	0,9%	0,1%	21	8
Kir., K.	CM-Cellu	1200	4410000	0,03	337600	1052000	0,3%	0,0%	9	1
Klo., D.	CM-Cellu	3800	3370000	0,11	68400	743600	1,2%	0,0%	8	0
Kre., R.	CM-Cellu	18000	2268000	0,79	319600	358000	1,2%	0,0%	38	1
Rie., E.	CM-Cellu	10944	2342000	0,47	455600	572000	1,6%	7,5%	72	429
Schw., R.	CM-Cellu	4800	2640000	0,18	486400	194000	1,8%	2,1%	85	40
Mittelwert	CM-Cellu	6649			331371	640229	1,2%	1,6%	43	123
STABW		5826			143159	310489	0,5%	3,0%	31	193
<i>t- Test mit Gey.</i>										0,27
<i>t- Test o. Gey.</i>										0,55

		Total			PF	NF	PF	NF	PF	NF
Patient	Partikel	Tumorzellen im LSC gemessen pro ml Blut	Gesamtzell- zahl der Probe pro ml Blut	daraus errechneter Tumorzell- anteil (LSC basiert) [%]	PF Anzahl Zellen pro ml	NF Anzahl Zellen pro ml	Anteil Tumorzellen in Gesamtzell- zahl PF [%]	Anteil Tumorzellen in Gesamtzell- zahl NF [%]	Tumorzell- zahl in PF (aus FACS)	Tumorzell- zahl in NF (aus FACS)
Gey., D.	CM-Dex	3800	2346750	0,16	798000	156800	0,8%	8,4%	61	132
Häd., W.	CM-Dex	4000	3315000	0,12	325600	1001000	0,7%	0,0%	23	3
Kir., K.	CM-Dex	1200	4410000	0,03	323600	1082000	0,2%	0,0%	6	1
Klo., D.	CM-Dex	3800	3370000	0,11	128800	670000	1,0%	0,0%	13	3
Kre., R.	CM-Dex	18000	2268000	0,79	556800	678400	1,1%	0,0%	61	3
Rie., E.	CM-Dex	10944	2342000	0,47	749200	122400	0,8%	3,2%	58	39
Schw., R.	CM-Dex	4800	2640000	0,18	676800	120800	1,6%	2,7%	109	33
Mittelwert	CM-Dex	6649			508400	547343	0,9%	1,0%	47	30
STABW		5826			253054	416118	0,5%	1,5%	36	47
<i>t- Test mit Gey.</i>										0,38
<i>t- Test o. Gey.</i>										0,04
Gey., D.	Dex	3800	2346750	0,16	885200	222400	0,6%	2,3%	49	52
Häd., W.	Dex	4000	3315000	0,12	426000	1035000	0,7%	0,0%	29	3
Kir., K.	Dex	1200	4410000	0,03	484800	974000	0,1%	0,0%	4	1
Klo., D.	Dex	3800	3370000	0,11	328800	604000	0,4%	0,1%	13	4
Kre., R.	Dex	18000	2268000	0,79	626800	572800	0,7%	0,6%	45	35
Rie., E.	Dex	10944	2342000	0,47	762800	96000	0,8%	1,3%	59	12
Schw., R.	Dex	4800	2640000	0,18	686800	137600	1,3%	0,7%	92	9
Mittelwert	Dex	6.649			600171	520257	0,7%	0,4%	41	17
STABW		5.826			197143	386384	0,4%	0,5%	30	19
<i>t- Test mit Gey.</i>										0,07
<i>t- Test o. Gey.</i>										0,06

3.5.2. Berechnungen zum Einsatz der Innovent-Partikel

Patient	Partikel	Total Tumorzellen im LSC gemessen pro ml Blut	Gesamtzell- zahl der Probe pro ml Blut	daraus errechneter Tumorzell- anteil (LSC basiert) [%]	PF PF Anzahl Zellen pro ml	NF NF Anzahl Zellen pro ml	PF Anteil Tumorzellen in Gesamtzell- zahl PF [%]	NF Anteil Tumorzellen in Gesamtzell- zahl NF [%]	PF Tumorzell- zahl in PF (aus FACS)	NF Tumorzell- zahl in NF (aus FACS)
Pau., E.	CM-Dex	7020	2797500	0,25	1028000	271600	2,7%	1,1%	27550	3069
Pöt., A.	CM-Dex	3488	2211500	0,16	439200	1115000	5,1%	1,2%	22311	13715
Scha., S.	CM-Dex	5124	4100000	0,12	625200	706400	1,1%	0,3%	7002	2119
Wei., H.	CM-Dex	1376	7775000	0,02	280000	964400	0,9%	0,1%	2492	1157
Win., U. I	CM-Dex	defekt	5520000	defekt	177600	1136000	0,4%	0,7%	639	82
Win., U. II	CM-Dex	0,001	7937500	0,00	444000	546000	0,2%	0,0%	755	109
Mittelwert	CM-Dex	3402			499000	789900	1,7%	0,6%	10125	3375
STABW		2817			301207	343808	1,9%	0,5%	11815	5196
t- Test										0,13
Pau., E.	V200	7020	2797500	0,25	42400	1276000	19,5%	8,6%	8260	109991
Pöt., A.	V200	3488	2211500	0,16	337600	1052000	0,3%	0,0%	945	105
Scha., S.	V200	5124	4100000	0,12	247600	947600	3,6%	1,5%	8815	14498
Wei., H.	V200	1376	7775000	0,02	40400	1341000	1,9%	0,8%	768	10058
Win., U. I	V200	defekt	5520000	defekt	63200	1437000	0,6%	0,3%	404	3736
Win., U. II	V200	0,001	7937500	0,00	45600	1063000	1,2%	0,2%	547	2551
Mittelwert	V200	3402			129467	1186100	4,5%	1,9%	3290	23490
STABW		2817			129779	192377	7,4%	3,3%	4073	42707
t- Test										0,27

		Total			PF	NF	PF	NF	PF	NF
Patient	Partikel	Tumorzellen im LSC gemessen pro ml Blut	Gesamtzell- zahl der Probe pro ml Blut	daraus errechneter Tumorzell- anteil (LSC basiert) [%]	PF Anzahl Zellen pro ml	NF Anzahl Zellen pro ml	Anteil Tumorzellen in Gesamtzell- zahl PF [%]	Anteil Tumorzellen in Gesamtzell- zahl NF [%]	Tumorzell- zahl in PF (aus FACS)	Tumorzell- zahl in NF (aus FACS)
Pau., E.	V208/2	7020	2797500	0,25	816400	23200	2,8%	0,4%	22941	86
Pöt., A.	V208/2	3488	2211500	0,16	1051000	216000	3,4%	1,3%	35629	2700
Scha., S.	V208/2	5124	4100000	0,12	874400	59600	0,7%	1,1%	6296	656
Wei., H.	V208/2	1376	7775000	0,02	601200	45200	0,2%	0,2%	1082	86
Win., U. I	V208/2	defekt	5520000	defekt	940800	177200	0,1%	0,0%	847	53
Win., U. II	V208/2	0,001	7937500	0,00	668800	88000	0,2%	0,1%	1338	114
Mittelwert	V208/2	3402			825433	101533	1,2%	0,5%	11355	616
STABW		2817			168216	77562	1,5%	0,5%	14597	1046
t- Test										0,11
Pau., E.	V209	7020	2797500	0,25	793600	48800	4,1%	20,0%	32696	9736
Pöt., A.	V209	3488	2211500	0,16	857200	297600	4,1%	5,5%	34802	16308
Scha., S.	V209	5124	4100000	0,12	633200	114400	1,4%	5,6%	8548	6406
Wei., H.	V209	1376	7775000	0,02	358400	88800	0,4%	0,5%	1362	426
Win., U. I	V209	defekt	5520000	defekt	794000	209200	0,2%	0,0%	1747	42
Win., U. II	V209	0,001	7937500	0,00	503200	78400	0,2%	0,3%	906	204
Mittelwert	V209	3402			656600	139533	1,7%	5,3%	13344	5520
STABW		2817			195392	94883	1,9%	7,6%	16067	6621
t- Test										0,12

Lebenslauf

Julia Kühn
Lindenweg 10
07407 Rudolstadt
Mail: kuehnjulia@aol.com

Persönliche Daten:

Geburtsdatum /-ort: 21.02.1981 / Rudolstadt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1987 - 1991	Besuch der Grundschule „Anton Sommer“ Rudolstadt
1991 - 1999	Besuch des Staatlichen Gymnasiums „Fridericianum“ Rudolstadt

Berufsausbildung:

09/1999 - 08/2002	Ausbildung zur staatlich examinierten Krankenschwester Kreiskrankenhaus Rudolstadt
09/2002 – 09/2003	Tätigkeit als Krankenschwester, Internistische Intensivstation Kreiskrankenhaus Rudolstadt

Hochschulausbildung:

10/2003 – 03/2010	Studium der Humanmedizin an der Friedrich Schiller Universität Jena
- seit 02/2007	Promotion am Onkologischen Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin II der FSU Jena bei Prof. Dr. A. Hochhaus zum Thema „Modulation der Aufnahme von magnetischen Nanopartikeln durch Tumorzellen und Leukozyten – Einsatz von Zuckerderivaten“

Berufliche Tätigkeit:

seit 04/2010	Assistenzärztin in den Thüringen Kliniken Saalfeld
--------------	--

Rudolstadt, den 25.05.2010

Danksagung

Mein Dank gilt Hr. Prof. Dr. A. Hochhaus für die freundliche Überlassung des Themas.

Ich danke Hr. Dr. J. Clement und dem gesamten Team des Onkologischen Forschungslabors Jena für die Unterstützung, den Ansporn, die konstruktive Kritik und die vielen Tipps, die ein Gelingen dieser Arbeit erst ermöglichten.

Besonderer Dank gebührt den vielen freiwilligen Blutspendern aus Nachbarschaft, Familien- und Freundeskreis.

Ich danke allen Familienmitgliedern, Kollegen und Freunden, die mir durch ihre Geduld und gezieltes Nachfragen halfen, diese Arbeit voran zu bringen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

dass ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

dass mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. Joachim Clement,

dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Rudolstadt, den 25.05.2010